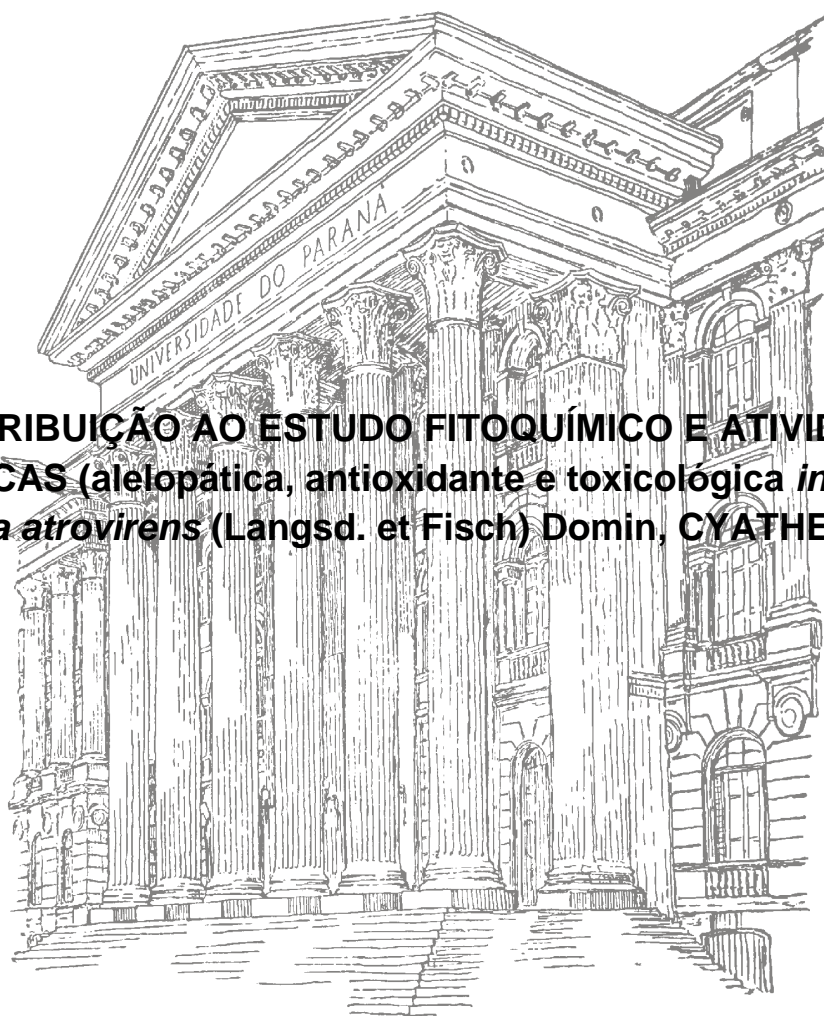


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARILEDA ZUCHETTO

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS (alelopática, antioxidante e toxicológica *in vitro*) DE
Cyathea atrovirens (Langsd. et Fisch) Domin, CYATHEACEAE**



CURITIBA

2014

MARILEDA ZUCHETTO

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS (alelopática, antioxidante e toxicológica *in vitro*) DE
Cyathea atrovirens (Langsd. et Fisch) Domin, CYATHEACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel

Co-Orientador: Prof^o Dr^o Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pela vida, por me guiar, ajudar a vencer os obstáculos e permitir que os meus caminhos levassem a esse acontecimento.

Aos meus pais, **João e Zélia** pelo incentivo, apoio, compreensão, dedicação, carinho e amor.

Ao meu marido **Flávio**, pelo amor, pela paciência e compreensão. Pelas palavras de apoio nos dias difíceis e por sua eterna disposição em tornar me uma pessoa melhor.

A minha **família**, pela torcida.

A **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade.

A minha orientadora **Profª Drª. Marilis Dallarmi Miguel** pela confiança, dedicação, convívio e amizade. Obrigada por me ajudar a crescer como pessoa e profissional.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel**, pelos conhecimentos a mim repassados, dedicação, confiança e amizade.

Aos colegas de laboratório de Fitoquímica e Farmacotécnica pela amizade e companhia. Em especial a **Vinícius B. de Oliveira, Cristiane da Silva de Paula, Francis José Zortéa Merino, Cristiane Bezerra, Mariana Saragiotto Krause, Juliana Kulik e Luciane Dalarmi** pelo apoio, ajuda, companheirismo e amizade.

A professora **Josiane Fátima de Gaspari Dias** pelo incentivo nos trabalhos e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao nosso técnico de laboratório **Paulo Sérgio Diniz**, pelo apoio sempre prestado.

Aos **meus amigos** pela amizade e companheirismo.

Ao biólogo **Osmar dos Santos Ribas** e aos funcionários do Museu Botânico Municipal de Curitiba pelas informações, pela identificação e pelo depósito do exemplar da espécie em estudo.

A **CAPES** pela bolsa e pelos recursos e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos os **funcionários e professores** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que de diversas maneiras contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado.

A todos que de maneira direta ou indireta colaboraram para que este estudo fosse realizado.

A todos a minha mais sincera gratidão.

*Pelos prados e campinas verdejante eu vou, é o Senhor que me leva a descansar.
Junto às fontes de águas puras repousantes eu vou, minhas forças o Senhor vai
animar.
Tu és, Senhor, o meu pastor, por isso nada em minha vida faltará.*

Salmo 23

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo estudar as frondes da espécie *Cyathea atrovirens*, pertencente à família Cyatheaceae. A partir das frondes coletadas em Balneário de Piçarras, localizado no estado de Santa Catarina, onde o extrato etanólico foi preparado por turbólise e o mesmo foi particionado com solventes de diferentes polaridades. O extrato bruto e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a remanescente os quais foram realizados os estudos das atividades biológicas onde foi verificada a atividade toxicológica pelo teste “*in vitro*” com *Artemia salinae* hemólise realizada com sangue de carneiro, não apresentaram atividade nos modelos testados. Pelo método Folin-Ciocalteu foi comprovado que esta espécie possui alto teor de polifenóis e capacidade antioxidante comprovada pelos métodos DPPH e Fossfomolibdênio. Na atividade sobre neutrófilos humanos pelo método NBT e PMA a espécie mostrou atividade em relação ao controle positivo, o PMA. Nos ensaios de atividade alelopática, foi verificado que os extratos e frações, inibiram ou estimulou de forma geral a germinação e o crescimento, estes efeitos podem ser resultantes da presença de substâncias fenólicas, provocando efeitos de estímulo.

Palavras-chave: *Cyathea atrovirens*. Cyatheaceae. Atividade Antioxidante. Polifenóis. Toxicidade Preliminar.

ABSTRACT

The present work aimed to study the fronds of *Cyathea atrovirens* species belonging to the family Cytheaceae. From fronds collected in Balneário Piçarras, located in the state of Santa Catarina, where the ethanol extract was prepared by turbolise and it was partitioned with solvents of different polarities. The crude extract and hexane fractions, chloroform, ethyl acetate and the remainder which the studies of biological activities which were verified through the toxicological exam "in vitro" test with *Artemia salina* and hemolysis performed with sheep blood, the exams showed no activity in the test models. By the Folin - Ciocalteu method it was proved that this species is high in polyphenols and antioxidant capacity that was proved by the methods DPPH and phosphomolybdenum. Regarding the activity on human neutrophils through the method NBT and PMA the species showed activity in relation to the positive control, the PMA. In trials of alleopathic activity, it was verified that the extracts and fractions inhibited or stimulated in a general form the germination and the growth, these effects can be a result of the presence of phenolic substances, proving stimulus effects.

Keywords: *Cyathea atrovirens*. Cytheaceae. Antioxidant activity. Polyphenols. Preliminary toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE <i>Cyathea atrovirens</i> NO COLORIDO DO MAPA.....	24
FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DAS ATIVIDADES DE <i>Cyathea atrovirens</i>	28
FIGURA 3 – REGISTRO DA EXSICATA DEPOSITADA NO MUSEU BOTÂNICO...	29
FIGURA 4 – EXSICATA DA ESPÉCIE <i>Cyathea atrovirens</i>	29
FIGURA 5 – MOINHO DE FACAS E MARTELO, UTILIZADO PARA MOER A ESPÉCIE <i>Cyathea atrovirens</i>	39
FIGURA 6 – PLANTA SECA, TRITURADA E ARMAZENADA ATÉ O MOMENTO DO PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.	40
FIGURA 7 – ESTRUTURA MOLECULAR DO 12-MIRISTATO, 13-ACETATO DE FORBOL (PMA)	49
FIGURA 8 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO DE <i>Cyathea</i> <i>atrovirens</i>	56
FIGURA 9 – REAÇÃO PARA POLIFENÓIS DO EXTRATO E FRAÇÕES DE <i>C.</i> <i>atrovirens</i> , PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU. A COLORAÇÃO AZUL, INDICA A PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	57
FIGURA 10 – CURVAS OBTIDAS PARA O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA, REMANESCENTE, E PADRÕES VITAMINA C E RUTINA.	60
FIGURA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DE <i>Cyathea atrovirens</i>	62
FIGURA 12 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES, PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	63
FIGURA 13 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA SOMENTE COM NBT, SEM A FORMAÇÃO DE GRÂNULOS AZUIS	69
FIGURA 14 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DO CONTROLE NEGATIVO SEM TRATAMENTO	70
FIGURA 15 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DO CONTROLE POSITIVO (PMA)	70

FIGURA 16 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 2,5 µg/mL DA AMOSTRA	70
FIGURA 17 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 5 µg/mL DA AMOSTRA	71
FIGURA 18 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 10 µg/mL DA AMOSTRA	71
FIGURA 19 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 15 µg/mL DA AMOSTRA	71

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Cyathea atrovirens</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A VITAMINA C	64
GRÁFICO 2 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Cyathea atrovirens</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A RUTINA	64
GRÁFICO 3 – CRESCIMENTO MÉDIO DA RAIZ DE PLÂNTULAS DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÕES HEXANO (FH), CLOROFÓRMIO (FCL) ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FRE) DE <i>Cyathea atrovirens</i> . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE SKOTT- KNOTT.....	67
GRÁFICO 4 – CRESCIMENTO MÉDIO DA RAIZ DE PLÂNTULAS DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÕES HEXANO (FH), CLOROFÓRMIO (FCL) ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FRE) DE <i>Cyathea atrovirens</i> . DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE SKOTT- KNOTT.....	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE <i>Cyathea atrovirens</i> ...	24
TABELA 2 – SOLUÇÕES E BRANCO COM RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES PARA METODOLOGIA DE FOLIN-CIOCALTEAU	43
TABELA 3 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL SECO E TRITURADO OBTIDO DAS FRONDES DE <i>C. atrovirens</i>	50
TABELA 4 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO A 20% DE <i>C. atrovirens</i>	51
TABELA 5 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20% DE <i>C. atrovirens</i>	52
TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS A FRIO POR TURBÓLISE	53
TABELA 7 – MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> e DL ₅₀	54
TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HEMÓLISE DE <i>C. atrovirens</i>	55
TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS EM mg/g DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	58
TABELA 10 – RESULTADOS DE IC ₅₀ E DO TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH.....	61
TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO	63
TABELA 12 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO HEXANO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E FRAÇÃO REMANESCENTE DE <i>C. atrovirens</i>	66
TABELA 13 – ATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE <i>Cyathea atrovirens</i> SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
DP	Desvio Padrão
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
PMA	Forbol miristato
NBT	Tetrazólio nitrobul
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio biidratado
CaCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de cálcio hexaidratado
DL ₅₀	Dose letal média
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
HCL	Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
KCl	Cloreto de potássio
M	Molar
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexaidratado
N	Normal
NaOH	Hidróxido de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
Na ₃ PO ₄	Fosfato de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	Molibdato de amônio tetraidratado
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
v/v	Volume/volume
PBS	Salina tamponada com fosfatos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 SAMAMBAIAS.....	19
3.2 FAMÍLIA CYATHEACEAE	20
3.3 DESCRIÇÃO DO GÊNERO <i>Cyathea</i>	21
3.4 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Cyathea atrovirens</i>	22
3.4.1 Distribuição geográfica no Brasil	23
3.4.2 Classificação taxonômica da espécie <i>C. atrovirens</i>	24
3.5 ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE <i>C. atrovirens</i>	25
3.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	25
3.6.1 Grupos fenólicos	26
3.6.2 Antioxidantes.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	28
4.2 ENSAIOS DE PUREZA	30
4.2.1 Teor de umidade	30
4.2.2 Teor de cinzas.....	30
4.3 ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA	30
4.3.1 Metabólitos solúveis em álcool.....	31
4.3.1.1 Pesquisa de alcaloides.....	31
4.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas	32
4.3.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico.....	32
4.3.1.4 Pesquisa de flavonóis.....	33
4.3.1.5 Pesquisa de dihidroflavonois	33
4.3.1.6 Pesquisa de cumarinas	33
4.3.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos.....	34

4.3.1.8 Pesquisa de esteróides e triterpenos	34
4.3.2 Metabólitos solúveis em água	35
4.3.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos	35
4.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	36
4.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	36
4.3.2.4 Pesquisa de taninos	37
4.3.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis	37
4.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos	38
4.3.2.7 Pesquisa de amino grupo	38
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES	39
4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE <i>Artemia salina</i>	40
4.5.1 Preparo da solução salina	40
4.5.2 Eclosão dos ovos	41
4.5.3 Preparo das Amostras contendo extrato bruto e frações de <i>C. atrovirens</i>	41
4.5.4 Avaliação da toxicidade	41
4.6 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA <i>in vitro</i>	42
4.7 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU ..	42
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	44
4.8.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio	44
4.8.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH	44
(2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	44
4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	45
4.9.1 Teste de germinação	46
4.9.2 Teste de Crescimento	47
4.10 ATIVIDADE SOBRE OS NEUTRÓFILOS HUMANO	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	50
5.2 PESQUISAS DE GRUPOS FITOQUÍMICOS	51
5.3 RENDIMENTO DO EXTRATO E FRAÇÕES	52
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOBRE <i>Artemia salina</i>	53
5.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	54
5.6 DOSAGENS DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	56
5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	58

5.7.1 Avaliação da Atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	59
5.7.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio.....	62
5.8 ATIVIDADE ALELOPÁTICA	65
5.8.1 Efeitos sobre a germinação.....	65
5.8.2 Avaliação do crescimento.....	66
5.9 ATIVIDADES SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS	68
5 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas como medicamento provavelmente seja tão antiga quanto o aparecimento do próprio homem. A preocupação com a cura de doenças ao longo da história da humanidade, sempre se fez presente. Toda planta que é administrada de alguma forma e, por qualquer via ao homem ou animal exercendo sobre eles uma ação farmacológica qualquer, é denominada de planta medicinal. As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de substâncias ativas.

Além dos benefícios observados, muitas reações tóxicas têm sido associadas a plantas, são observadas a necessidade de estudos criteriosos relativos à sua utilização. Diferentes autores tem apontado a importância dos estudos químicos e farmacológicos, em varias espécies vegetais, pela intensa produção de metabolitos secundários, que podem ser medicinais ou tóxicos (BRITO; BRITO, 1993).

Este metabolismo secundário se diferencia do primário, basicamente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo, portanto específico de determinados grupos (SOSSAE, 2007).

Portanto a droga vegetal torna-se medicamento somente quando é usada corretamente. A recomendação de uso com segurança verdadeiramente medicinal e inclusão na farmacopeia requer a identificação do princípio ativo ou tê-lo evidenciado farmacologicamente. Para isso devem ser desenvolvidos estudos farmacológicos, pré-clínicos, toxicológicos e químicos visando o isolamento e caracterização do princípio ativo. As plantas medicinais se diferem dos medicamentos industriais apenas pela embalagem e pelas substâncias, corantes, aromatizantes, flavorizantes e conservantes que acompanham o princípio ativo nesse tipo de medicamento (LORENZI; MATOS, 2002).

Um dos aspectos mais delicados na fitoterapia, terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, consiste na identidade das plantas. Por ser baseada em nomes populares a verdadeira identidade das plantas pode variar enormemente de uma região para outra, assim como plantas completamente diferentes podem ter o mesmo nome popular, e ainda

algumas plantas têm uma variedade de nomes para a mesma espécie (LORENZI; MATOS, 2002).

Devido à inexistência de informações nas literaturas técnicas e científicas acerca das atividades químicas e biológicas de espécies do gênero *Cyathea*, espera-se com este trabalho contribuir para a avaliação das atividades biológicas da espécie em estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico bioquímico e aplicado às atividades biológicas de *Cyathea atrovirens*, pertencente à família Cyatheaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o perfil físico-químico do extrato bruto da espécie *Cyathea atrovirens* e realizar a análise fitoquímica preliminar da mesma;
- Fracionar o extrato bruto da espécie selecionada para o estudo;
- Avaliar a atividade toxicológica do extrato bruto e frações frente *Artemia salina*;
- Analisar a atividade toxicológica in vitro do extrato bruto e frações;
- Realizar o doseamento de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando-se da metodologia espectrofotométrica para determinar a quantidade de polifenóis no extrato bruto e frações;
- Analisar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações pelo método Fosfomolibdênio;
- Analisar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações pelo método DPPH;
- Avaliar a atividade alelopática do extrato bruto e frações;
- Avaliar a atividade sobre neutrófilos humanos do extrato bruto pelo método do NBT com PMA.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SAMAMBAIAS

As samambaias são conhecidas como fetos arborescentes, feto porque quando na fase do báculo (broto), que se da origem a uma nova fronde o formato desses assemelha-se a um feto no útero. Foram as primeiras “árvores” que o planeta conheceu desde a sua evolução. Elas surgiram no período Carbonífero há 318 milhões de anos, e tiveram uma considerável expansão no Cretáceo (LARGE; BRAGGINS, 2004). Cyatheaceae e Dicksoniaceae englobam a grande maioria das espécies de samambaias com portearborescente (FERNANDES, 2003), sendo que nas regiões neotropicais ocorrem cerca de 180 espécies (TRYON; TRYON, 1982).

As samambaias que apresentam significativa faixa de ocupação estão distribuídas desde o nível do mar até próximas ao limite da vegetação de grandes altitudes, nas regiões tropicais. Essas plantas apresentam adaptações morfológicas que incluem plantas de poucos milímetros de comprimento a frondosas espécies arborescentes que podem atingir até 20 metros de altura para ocupar esse amplo habitat (PAGE, 1979; WINDISCH, 1992).

Cerca de 50 espécies de samambaias arborescentes são cultivadas na Europa e nos Estados Unidos, e de acordo com o autor, a temperatura é o principal critério a ser considerado para a seleção da planta para o cultivo. (HOSHIZAKI 1979).

A propagação das samambaias iniciou na Royal Botanic Gardens Kew, na Inglaterra, em 1974 John Lindsay, um cirurgião britânico que viajava pela Jamaica, observou que após períodos de chuvas, havia pó de samambaia no solo, e que desse pó nasciam às samambaias, e não de sementes (OLSEN; SUE, 2007).

As samambaias viraram moda no decorrer do tempo, estando presentes em várias residências, apresentando efeito decorativo e suporte para epífitas como orquídeas e bromélias, e algumas estando sujeitas a extrativismo, e outras espécies já apresentam problemas de conservação, como a *Dicksonia sellowiana* (WINDISCH, 2002).

O crescimento e fertilidade das samambaias podem estar primariamente relacionados com temperatura (MEHLTRETER, 2008). Se compararmos o crescimento de samambaias com outras plantas vasculares, ele pode parecer lento, mas mesmo assim elas podem atingir alturas que ultrapassam o sub-bosque (SCHMITT; WINDISCH, 2006).

3.2 FAMILIA CYATHEACEAE

A família Cyatheaceae engloba a maioria das samambaias arborescentes, conhecidas entre nós como samambaias. Caracteristicamente, o esporófito adulto apresenta um tronco ereto com uma coroa de frondes no ápice, no qual são evidentes as cicatrizes foliares, o caule é fino, de diâmetro uniforme e é totalmente revestido por raízes adventícias negras, engrossando muito (JOLY, 1983).

A família Cyatheaceae apresenta 480 espécies com distribuição pantropical (TRYON; TRYON, 1982). Plantas arborescentes que podem ser rasteiras ou atingir até 25 m de altura (SPORNE, 1970). Formando populações densas em regiões montanhosas, sendo dominantes na fisionomia da vegetação (TRYON; TRYON, 1982), podendo ocorrer dispersas no interior de formações florestais, ou ainda, dispersas em habitats mais abertos, entre vegetação de baixo porte (FERNANDES, 1997).

Tryon e Tryon (1982), descrevem seis gêneros descritos na família Cyatheaceae: *Alsophila*, *Cnemidaria*, *Cyathea*, *Sphaeropteris*, *Nephelea* e *Trichipteris*, os quais ocorrem na América tropical. As relações entre os gêneros são originárias da variedade de detalhes nos pecíolos com escamas e com espinhos, da presença positiva ou negativa do indúcio, da quantidade de esporos por esporângios, da ornamentação dos esporos e anatomia do caule.

Lellinger (1987) descreve que a família Cyatheaceae é composta por apenas quatro gêneros *Alsophila*, *Cnemidaria*, *Cyathea* e *Sphaeropteris*.

3.3 DESCRIÇÃO DO GÊNERO *Cyathea*

As plantas do gênero *Cyathea* são chamadas de samambaias e possuem importante interesse ornamental. O gênero compreende cerca de 300 espécies com predominância no hemisfério Sul, 50 espécies na América Central, 25 na África e mais de 40 na região do Pacífico e Ásia Austral. No Brasil possuímos espécies em várias regiões (GOLA *et al.*, 1965; SEHNEN, 1978).

Cyathea schanschin e *Cyathea hirtula*, crescem nas matas serranas com predominância nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Já as espécies *Cyathea vestita* e *Cyathea feei* encontram-se em matas de morro e capoeira, preferencialmente à beira de cursos de água. *Cyathea vestita* ocorre amplamente em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e *Cyathea feei* no Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Cyathea arborea* também ocorre nas regiões elevadas do país (SEHNEN, 1978).

Os estudos fitoquímicos do gênero *Cyathea* são escassos. A primeira investigação sobre os constituintes fenólicos do gênero *Cyathea* foi realizada por HARADA *et al.* (1955), que analisaram frondes de *Cyathea faurieri* e *Cyathea hancockii* durante um levantamento sobre a distribuição de flavonas, flavonóis e flavanonas nas samambaias japonesas. Entre as espécies estudadas 4 dessas contêm kanferol, cirtominetina e farrerol e uma flavona caracterizada como vitexina (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975).

Os flavonoides das samambaias, de acordo com a literatura, são primariamente restritos a quatro principais grupos: flavonóis, glicosilflavonas, flavonas e flavanonas. Outros flavonoides também encontrados nas samambaias, porém esporadicamente como antocianinas, xantonas, flavanonóis e as biflavonas (WALLACE, 1989).

Existem poucos dados na literatura a respeito das atividades biológicas das espécies do gênero *Cyathea*. Em Taiwan, o broto da espécie *Cyathea fauriei*, é usado na medicina popular para o tratamento de tumores (GRAHAM *et al.*, 2000). Na medicina popular do Brasil, *Cyathea phalerata* têm uso no combate as varizes, tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e o chá das frondes para tosse e gripes.

O flavonóide kanferol 3-O-(α)-L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glicopiranosídeo isolado de *Cyathea phalerata* apresentou atividade hipoglicemiante em animais diabéticos induzidos com aloxana, estudo recentemente realizado por Cazarolli (2004).

3.4 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Cyathea atrovirens*

Nome popular: xaxim de espinho e xaxim verde escuro, e sinônimos usados para a espécie em estudo são:

Alsophila atrovirens (Langsd.& Fisch.) C.Presl

Alsophila dryopteridoides Domin

Alsophila dryopteridoides var. *fallaciana* Domin

Alsophila hookeriana Hook.

Alsophila kleinii Sehnem

Alsophila leptocladia Fée

*Alsophila proceroide*s Rosenst.

Alsophila radens Kaulf.

Alsophila verruculosa Rosenst.

Cyathea compta Mart.

Cyathea fallaciana (Domin) Domin

Cyathea leptocladia (Fée) Domin

Cyathea radens (Kaulf.) Domin

Cyathea verruculosa (Rosenst.) Domin

Trichipteris atrovirens (Langsd.& Fisch.) Tryon

A espécie *Cyathea atrovirens* é uma samambaia arborescente, que ocorre desde o Paraguai, Uruguai, Argentina até o Brasil (PONCE, 1996). Especificamente no sul do Brasil, essa espécie ocorre na floresta ombrófila densa (SEHNEM, 1978). Também crescem em áreas úmidas ao longo de beira de estradas, barrancos úmidos e campos abandonados (LORSCHETTER *et al.*, 1999). Os cáudices dessa espécie que são envolvidos por bainha de raízes adventícias são utilizados para a fabricação de artefatos em fibras (FERNANDES, 2003), as folhas são cortadas para fins comerciais (TRYON; TRYON, 1982) e as plantas inteiras são removidas e empregadas na jardinagem.

C. atrovirens, apresenta cáudice de até aproximadamente 6 m de altura, com as partes basais dos estípites persistentes formando ângulo agudo com o cáudice ou apenas com restos de pecíolos, podendo estar engrossado por uma bainha de raízes adventícias. Os pecíolos são ascendentes, longos, até 1,10 m de comprimento, com espinhos dispostos ao longo do mesmo.

3.4.1 Distribuição geográfica no Brasil

No mapa do Brasil na Figura 1, observamos a distribuição da *Cyathea atrovirens* sem colorido onde temos os Estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.



FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE *Cyathea atrovirens* NO COLORIDO DO MAPA.

FONTE: Flora do Brasil (2014)

3.4.2 Classificação taxonômica da espécie *C. atrovirens*

A tabela 1 nos mostra a classificação taxonômica atualizada da espécie em estudo.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE *Cyathea atrovirens*

HIERARQUIA	TAXONÔMICA
Divisão	Pterydophyta
Classe	Equisetopsida
Ordem	Cyatheaales
Família	Cyatheaceae
Gênero	<i>Cyathea</i>
Espécie	<i>Cyathea atrovirens</i> , (Langsd. & Fisch.) Domin

FONTE: TROPICOS (2014)

3.5 ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE *C. atrovirens*

Em um estudo foi comparado a germinação e o desenvolvimento do gametofítico de *Cyathea atrovirens* e *Alsophila setosa*, e observaram que *C. atrovirens* apresentou maiores taxas de germinação mesmo em baixas condições de luminosidade (AZEVEDO *et al.*, 2008).

Outro estudo foi comparado à germinação e desenvolvimento do gametofítico de *C. atrovirens* em diferentes condições de pH e viabilidade dos esporos após diferentes períodos de armazenamento a 7°C. A espécie demonstrou capacidade de germinação em diferentes níveis ácidos e a estocagem à temperatura estudada, não afetou as taxas de germinação (RECHENMACHER *et al.*, 2010).

Schmitt & Windisch (2012) observaram durante cinco anos o crescimento do cáudice e fenologia de *C. atrovirens* em floresta secundária no município de Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul. Registraram que os eventos fenológicos não foram influenciados pela precipitação e que as plantas apresentaram uma capacidade de manter o número de folhas estável no período observado.

Sant'anna (2001) em estudo microbiológico realizado com o extrato bruto feito do cerne de *C. atrovirens* demonstraram a atividade inibitória dessa espécie para as cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Trichopyton beigeli*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Candida tropicalis*, *Trichopyton rubrum*, *Trichopyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Fusarium sp.*

Não foram encontrados outros estudos biológicos de *C. atrovirens*, e dessa forma, outros ensaios que comprovem atividades como antioxidantes, hemolítica, alelopática e ativadora de neutrófilos, tornam-se necessárias.

3.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Na composição química da espécie tivemos vários grupamentos com resultados positivos, onde destacaremos a seguir o grupo dos fenóis, pois as atividades biológicas estão voltadas para esse.

3.6.1 Grupos fenólicos

Os grupos fenólicos possuem diversas ações biológicas, porém a ação antioxidante é a mais descrita na literatura científica, a ação antioxidante destes compostos deve-se a capacidade de sequestrar radicais e algumas vezes como quelantes de metais agindo tanto na iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Os polifenóis nas plantas possuem diferentes funções: proteção contra raios ultravioleta e visível; proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais para polinização; antioxidantes; controle de ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibição de enzimas (ZUANAZZI, 200; HAVSTEEN, 2002).

Existem diversas classes de compostos fenólicos que ocorrem de maneira universal nas plantas vasculares e que podem desempenhar importantes papéis na biologia dos animais, principalmente nos fitófagos. Como exemplos, podem-se citar os ácidos fenólicos, como os ácidos benzóicos, cafeico, cumárico e ferúlico, e os flavonóides, como a apigenina, o canferol e a quercetina (MARCUCCI, 1998).

Vários ensaios *in vitro* e *in vivo* estão comprovando as atividades biológicas dos flavonóides. Destacam-se, a capacidade antioxidante, antiinflamatória, ação antialérgica, antitumoral, hepatoprotetora, antiúlcera, bem como ações antimicrobianas e antivirais (LOPES *et al.*, 2000).

3.6.2 Antioxidantes

Quando são produzidos radicais livres nos seres vivos, essa reação é controlada por diferentes substâncias antioxidantes que podem ser endógenas ou provenientes da dieta alimentar, como ácido ascórbico, α -tocoferol e polifenóis. Quando ocorre limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocasionar lesões oxidativas de caráter cumulativo (SOUZA *et al.*, 2007).

Entre as diversas classes de antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido grande atenção, como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides e outros. Por suas propriedades redutoras e estruturas

químicas, estas substâncias têm capacidade de seqüestrar radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo os intermediários formados relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente nas estruturas (YAMAGUCHI, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado de acordo com o fluxograma demonstrado na Figura 2.

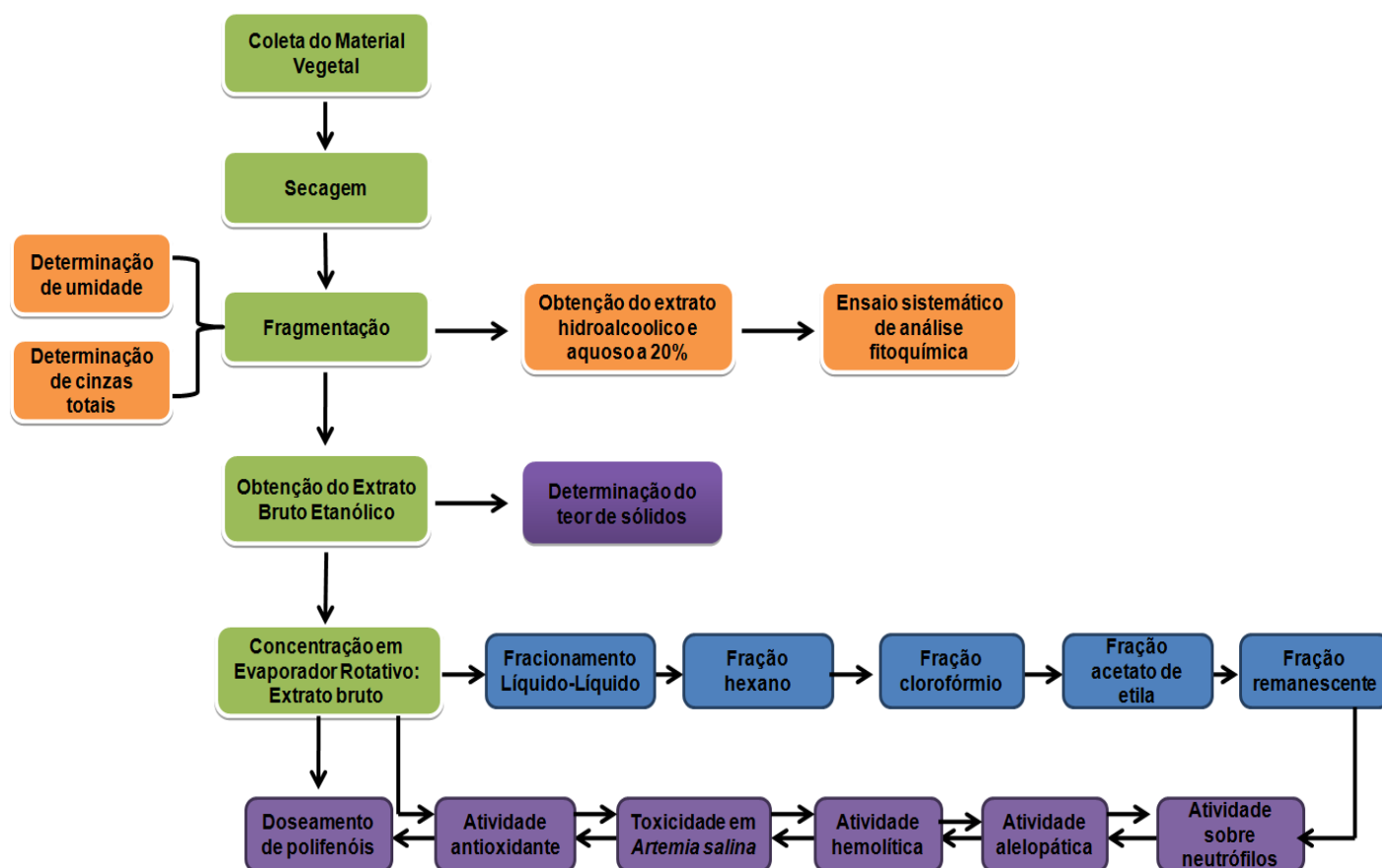


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DAS ATIVIDADES DE *Cyathea atrovirens*

FONTE: A autora (2014)

4.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

As amostras das frondes de *C. atrovirens* foram coletadas no Balneário de Piçarras no estado de Santa Catarina no mês de outubro de 2013, com coordenadas via GPS 26044'0389''S e 48041'3363''O.

A exsicata da espécie *C. atrovirens* foi registrada no Museu Botânico de Curitiba pelo número MBM382662, conforme as Figuras 3 e 4.


	PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL	HERBÁRIO Nº 382662
	Cyatheaceae <i>Cyathea atrovirens</i> (Langsd. & Fisch.) Domin Det.: Labiak, P. 19 / 10 / 2013 Brasil, Santa Catarina, Balneário Piçarras. Zuchetto, M. s.n.; 07/10/2013	
Duplicatas: MBM,UPCB,HCF,UNOP,FURB,UEC,ICN,WU PMC - DPP 004		

FIGURA 3 – REGISTRO DA EXSICATA DEPOSITADA NO MUSEU BOTÂNICO

FONTE: A autora (2013)



FIGURA 4 – EXSICATA DA ESPÉCIE *Cyathea atrovirens*

FONTE: A autora (2013)

4.2 ENSAIOS DE PUREZA

4.2.1 Teor de umidade

Para a análise de umidade foram realizados testes em triplicata das frondes de *C. atrovirens*, um grama da droga foi pesada e colocada em cadinho previamente dessecado em estufa a 100°C e posteriormente seu peso zerado em balança em seguida foram submetidos os cadinhos contendo amostra da droga ao aquecimento em estufa a 100°C até a obtenção de um peso constante. Os cadinhos foram retirados da estufa e colocados para resfriamento em dessecador e posteriormente pesados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.2.2 Teor de cinzas

Para a análise do teor de cinzas, os resíduos de sólidos inorgânicos metálicos presentes na amostra seca do ensaio anterior foram utilizados, sendo estes incinerados a 600°C até o peso constante (aproximadamente por 6 horas). Os cadinhos foram retirados da mufla e levados ao dessecador até seu resfriamento. A seguir a amostra foi pesada rapidamente para determinação da % do teor das cinzas presentes na amostra. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.3 ENSAIOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os ensaios fitoquímicos preliminares são fundamentais pois quando não se possui estudos sobre a espécie *Cyathia atrovirens*. O ensaio sistemático tem como objetivo a identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das espécies vegetais, através da identificação por reações de precipitação ou

coloração. Assim, para estes ensaios com a espécie *C. atrovirens* foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979), com adaptações, descritas a seguir.

4.3.1 Metabólitos solúveis em álcool

Para obtenção do extrato hidroalcoólico a 20%, foi utilizado 40g de material vegetal seco em estufa e estabilizado em 200 mL de álcool etílico, a 70% v/v. Este material foi deixado em maceração em banho-maria, a 70°C, por aproximadamente uma hora. Após este período o material foi filtrado em papel filtro e completado o volume com água destilada para 200 mL. Após este processo o extrato foi concentrado em banho maria até um terço do seu volume e em seguida particionado com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, em funil de separação. Para cada fração foram utilizados 20 mL do extrato e o volume completado para 200mL, com o próprio solvente. O resíduo do extrato constituiu a fração hidroalcoólica remanescente, tendo seu volume completado para 200mL com etanol. Essas 4 frações obtidas foram usadas para a pesquisa dos seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

4.3.1.1 Pesquisa de alcaloides

Foram utilizados para a pesquisa reativos conhecidos como reativos gerais para alcalóides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), ácido sílicotúngico (Reativo de Bertrand), p-dimetilamino benzaldeído (Reativo de Ehrlich) e Reativo de Vitali-Morin (promove a nitração de alcaloides). Foi retirado de cada fração foi uma amostra de 50 mL, depois foi evaporada em banho-maria a 50°C. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em 1mL de etanol e acrescentou-se 20mL de HCl 1%. Cada amostra foi testada em 5 tubos de ensaio, onde foram feitas alíquotas de 1mL do respectivo extrato clorídrico, para cada tubo foi adicionado duas gotas de um reativo.

Para análise dos resultados foi considerada positiva a presença de alcalóides na amostra quando apresentou as seguintes visualizações para os reativos:

- Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Um tubo somente com o extrato, serviu de controle negativo para comparar com os tubos que foi colocado o reativo.

4.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Nesse ensaio, foram levadas a secar 10mL das frações e em seguida, dissolvidas com 5mL de álcool etílico. Posteriormente foi adicionado 5 gotas de HCl concentrado, e levado ao aquecimento em banho maria até a ebulição. Para análise dos resultados através da amostra foi considerada a reação positiva pela presença da coloração vermelha.

4.3.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico

Para esta pesquisa foram utilizados 20mL de cada fração e foram levadas à secar e depois dissolvidas com 10mL de etanol. Em seguida, 5mL de cada fração foi transferida para cada tubo de ensaio, a fração hidroalcoólica não passou pela secar, e foi transferida diretamente ao tubo de ensaio. Em cada tubo foram adicionados lentamente 200mg de limalha de ferro e HCl fumegante. Resultado positivo é observado quando ocorre o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.3.1.4 Pesquisa de flavonóis

Foi utilizado para esta pesquisa o teste do oxálico bórico ou conhecida como reação de Taubock. Para o teste, 10mL de cada fração foram levados à secura depois adicionadas cinco gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), levando novamente a secura. A este resíduo foram adicionados 5mL de éter etílico. A visualização foi realizada em aparelho de ultravioleta, se houver fluorescência a reação é considerada positiva.

4.3.1.5 Pesquisa de dihidroflavonois

Foram adicionados 10 mL de cada fração em cápsulas de porcelana, levados à secura em banho-maria. Foi aquecido em chama com alguns cristais de acetato de sódio, 0,1mL de anidrido acético e 0,1mL de HCl concentrado. Para análise do resultado o desenvolvimento de coloração roxa é considerado positivo.

4.3.1.6 Pesquisa de cumarinas

Para esta pesquisa, 30mL das frações foram concentradas, até atingir o volume de 5mL em banhomaria à 50°C, e em seguidas recuperadas com acetato de etila (5mL). A fração hidroalcoólica foi acidificada até pH 1 por adição de HCl 2N e 5mL de HCl concentrado. Esta mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico e após esse processo essas frações foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5mL. Das frações obtidas 3mL foram transferidos para tubos de ensaio, onde adicionaram-se 2mL de NaOH 2N. Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366nm por 15 minutos. Para reação positiva é observada fluorescência azul ou verde amarelada. Paralelamente, com o restante dos extratos etéreos, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro. As manchas 1 e 2

foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, colocou-se uma moeda, depois foram levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando em exposição por 15 minutos. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.3.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30mL das frações junto com 5mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, adicionando-se, em seguida, 30mL de H₂O. Após a mistura ser filtrada esta foi transferida para um funil de separação, para extração com éter (2 X 10mL). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de 5mL, e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se 5mL de NH₄OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva se houver a observação de coloração vermelha.

4.3.1.8 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Foram evaporadas 10 mL de cada fração até a secura e os resíduos redissolvidos em 5mL de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0mL estas foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2mL com clorofórmio.

Em seguida, foram realizadas as seguintes reações:

- Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1mL de anidridoacético e lentamente 2mL de H₂SO₄ concentrado.

A coloração obtida poderá indicar:

- Rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.
- Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.
- Amarela: grupamento metila no carbono 14.

- Reação de Keller Kelliani

Foi levado à secar 2mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2mL de ácido acético glacial e 0,2mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Após este processo as misturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de H_2SO_4 .

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

- azul: presença de esteróides;
- verde: presença de triterpenos.

4.3.2 Metabólitos solúveis em água

Para este teste com o extrato aquoso foi preparado 40g do vegetal e 200mL de água em banho-maria por uma hora, à 70°C. Após este processo o material foi filtrado e completado o volume com água até 200mL. Objetivo deste extrato é o de pesquisar os seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

4.3.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Para esta pesquisa foram separados 5mL do extrato em 3 tubos de ensaio. No primeiro tubo de ensaio colocou-se HCl 1% até pH 4. A presença de tons avermelhados indica que a reação é positiva. O segundo tubo de ensaio foi

alcalinizado com NaOH até pH 10, e se positivo observa-se tons azulados. O terceiro tubo de ensaio foi neutralizado a pH 7 com o aparecimento de tons violáceos. Após a neutralização, 10mL do extrato foram extraídos com álcool butílico em funil de separação por duas vezes.

Foram reunidas em uma capsula de porcelana as duas frações obtidas e concentradas até 5mL. Foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e aquecidos até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antocianidina.

4.3.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Foram utilizados para esse teste 3 tubos de ensaio com 5mL de extrato. Os tubos de ensaio foram agitados energicamente por cinco minutos e após este processo foi medida a quantidade de espuma formada. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1cm.

4.3.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Foram adicionados 5mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1mL de H₂SO₄ 10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico. Para preparar o papel picro-sódico para o teste, foram cortadas tiras de papel de filtro, com 1cm de largura e, estas foram embebidas em solução de ácido pícrico 1% e secas ao abrigo da luz. Após este processo as tiras de papel picro, já secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, e secas serão armazenadas em frasco âmbar.

4.3.2.4 Pesquisa de taninos

Para a pesquisa de taninos foi transferido 1mL de extrato aquoso para cincotubos de ensaio e adicionados aos mesmos os seguintes reagentes bem como a quantidade dos mesmos, conforme especificação abaixo relatada:

1: Adicionado ao extrato aquoso 3 gotas de cloreto férrico. O resultado é positivo para os taninos quando for coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado.

2: Adicionado ao extrato aquoso de 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. Coloração azul ou verde indica resultado positivo.

3: Adicionado ao extrato aquoso de 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina. Formação de precipitado indica resultado positivo.

4: Adicionado ao extrato aquoso 5mL de ácido acético(gota a gota) e 5mL de acetato de chumbo. Presença de precipitado indica resultado positivo.

5: Adicionado ao extrato aquoso 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Presença de precipitado indica resultado positivo.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis foi transferido 30mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato, e adicionado 6mL de formaldeído 40% e 4mL de ácido clorídrico 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, e depois de fria a mistura foi filtrada. O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool 50% e gotejado algumas gotas de KOH a 5%. A coloração verde indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado adicionou-se acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%, o aparecimento da coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.3.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Foram adicionados 5mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1mL de H₂SO₄ 10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos

cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico. Para preparar o papel picro-sódico para o teste, foram cortadas tiras de papel de filtro, com 1cm de largura e, estas foram embebidas em solução de ácido pícrico 1% e secas ao abrigo da luz. Após este processo as tiras de papel picro, já secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, e secas serão armazenadas em frasco âmbar. A presença desses ácidos é indicada pela coloração da fita de pH para valores abaixo de 7.

4.3.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Foram adicionados em um balão 20mL do extrato aquoso 2mL de NaOH 1N, que permaneceram em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, acidificou-se com H_2SO_4 2N e extraiu-se com éter etílico (3 porções de 10mL).

Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50°C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa por 10 minutos, resfriado e adicionados 5mL de NH_4OH 1N. Em uma tira de papel de filtro concentraram-se duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos. O ácido fórmico, propiônico e aminoacético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

4.3.2.7 Pesquisa de amino grupo

Para a realização deste teste foi utilizado 10mL do extrato aquoso e o mesmo foi concentrado até 5mL, a uma temperatura de 60°C. Em uma cromatoplaça de cromatografia de camada delgada foi depositada três gotas deste extrato concentrado, e após as gotas secarem sobre uma das manchas foi colocado uma gota de ninhidrina. A placa foi aquecida em estufa, por 15 minutos, com

temperatura de 90 - 100°C. A coloração azulviolácea indica a presença de aminogrupos.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

Para a obtenção do extrato bruto foi utilizado os processos de secagem e moagem do material, para a secagem a planta foi colocada inteira na estufa por aproximadamente 30 horas e temperatura de 50°C logo após foi triturada em moinho de facas e martelo (FIGURA 5) para diminuir a partícula facilitando a extrato e tornando mais eficaz, observando na figura 6 a planta seca e triturada.

O extrato bruto (EB) e frações, foram obtidos a partir de 1520 g do material vegetal seco e triturado, por turbólise em de 70% álcool e 30% de água. Este foi filtrado em funil e concentrado em evaporador rotativo.

O extrato bruto depois de concentrado foi utilizado para obtenção das frações através de extrações com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano (FHE), clorofórmio(FCL) e acetato de etila (FAE). Todas as frações foram levadas a secar em evaporador rotativo e banho maria.



FIGURA 5 – MOINHO DE FACAS E MARTELO, UTILIZADO PARA MOER A ESPÉCIE *Cyathea atrovirens*

Fonte: A autora (2013)



FIGURA 6 – PLANTA SECA, TRITURADA E ARMAZENADA ATÉ O MOMENTO DO PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.

Fonte: A autora(2013)

4.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente *Artemia salina*, segundo Meyer *et al.* (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2-20 mg) (DALL'STELLA, 2008).

4.5.1 Preparo da solução salina

A solução salina foi preparada com 38g de sal marinho (23,0 g de NaCl, 11,0 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 4,0 g de Na_2SO_4 , 1,3g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ou $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,7g KCl) e 1000mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com NaOH para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo LEWANet *al.* (1992), um pH superior a 6,0 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.5.2 Eclosão dos ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200mg/400mL) foram colocados em solução de salina para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C, e o pH entre 8,0 – 9,0. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação sobre o recipiente, depois dessa primeira hora foi suspensa a iluminação.

4.5.3 Preparo das Amostras contendo extrato bruto e frações de *C. atrovirens*

O estudo foi realizado com o extrato bruto e frações de *C. atrovirens*. As amostras (20mg) foram levadas à secar em banho-maria (40°C), e adicionados solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10mg/mL. Como solvente foi utilizado o metanol. Desta solução, 2,5, 25 e 250 µL foram transferidos com pipeta automática para os tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000µg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado em temperatura ambiente por 12 horas (DALL’STELLA, 2008).

4.5.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *A. salina* foram transferidas para cada tubo de ensaio contendo as amostras. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, os quais foram evaporados juntamente com as amostras. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina nas mesmas concentrações utilizadas para as amostras. O volume de todos os tubos foi ajustado com solução salina para 2,5 mL.

Após 24 horas, foi realizada a contagem dos náuplios mortos e vivos. Os dados foram analisados através do método estatístico Probitos e foram determinados os valores de DL₅₀ e DL₉₅ de intervalo de confiança. As amostras

foram consideradas ativas quando DL₅₀ for menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

4.6 AVALIAÇÃO HEMOLÍTICA *in vitro*

Para a separação dos eritrócitos, foi usado o sangue comercial (Newprov®) centrifugado e em seguida essas células foram lavadas com tampão fosfato pH 7,4 gelado, e preparado uma suspensão de eritrócitos.

Foram utilizadas quatro concentrações 1000, 500, 200 e 100 µL dos extratos e frações das frondes de *C.atrovirens*, que foram solubilizadas em tampão fosfato pH 7,4 em triplicata. Como controle positivo foi utilizado água destilada. Os microtubos foram levemente homogeneizados e incubados em estufa com temperatura de 37 °C. Após 3 h foram centrifugados por 5 min a 3000 rpm. Para resultados negativos há formação de um *pellet* bem definido de eritrócitos, e resultados positivos são verificados através da coloração vermelha do sobrenadante (WHO, 1998).

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo o método proposto por Banerjee *et al.* (2008), com adaptações.

4.7 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIICALTEAU

O método Folin-Ciocalteu descrito por Woisk & Salatino (1998), é um dos mais antigos para quantificar fenóis em uma amostra, também conhecido como ensaio de fenóis total. O método Folin-Ciocalteu é atualmente utilizado para mensurar a capacidade antioxidante de uma amostra. O sistema caracteriza-se por uma mistura de ácidos de coloração amarela em um meio básico. Os fenóis contidos nas amostras são oxidados em meio básico, resultando na formação de oxigênio (O₂ -), reagindo com os ácidos formando compostos de coloração verde, com absorção em 760 nm. O doseamento de polifenóis foi realizado com extrato total e suas frações. Para a realização desse doseamento foi feita uma curva padrão para calibração utilizando como padrão a substância ácido gálico nas concentrações de

10µg, 15µg, 20µg, 25µg, 30µg, 35µg e 40µg. As concentrações foram obtidas a partir de uma solução de ácido gálico 0,25mg/ml. Todas as concentrações foram realizadas em triplicata no volume de 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160µL. As soluções e o branco e suas respectivas concentrações estão expressas no Tabela 2.

TABELA 2 – SOLUÇÕES E BRANCO COM RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES PARA METODOLOGIA DE FOLIN-CIOCALTEAU

SOLUCÕES	BRANCO (uL)	TUBO 1 (uL)	TUBO 2 (uL)	TUBO 3 (uL)	TUBO 4 (uL)	TUBO 5 (uL)
ÁGUA	3600	3600	3600	3600	3600	3600
FOLIN	200	200	200	200	200	200
ÁGUA:ETANOL	160	120	100	80	60	40
AMOSTRA	-	160 ul	80	80	160	80
CaCO ₃	400	400	400	400	400	400

As soluções foram preparadas, agitadas e após 3 minutos colocadas à solução de carbonato de cálcio 10%. Para que a leitura seja realizada é necessário aguardar 30 minutos para que nesse tempo ocorra a reação com o reativo Folin-Ciocalteu. Após esse período a leitura das absorbâncias é realizada em espectrofotômetro a 760nm.

As medias das triplicatas foram colocados no programa Excel, na forma de tabela (concentração / absorbância) e com base nos dados foi construído um gráfico de dispersão, adicionando linha de tendência, exibindo equação do gráfico e valor de R^2 no gráfico.

Para esse doseamento com o extrato bruto e suas frações foi feita uma solução de 0,25mg/ml da respectiva fração, e feitas soluções iguais as soluções feitas para curva padrão, utilizando 10µg, 20µg, 30µg e 40µg no lugar da amostra.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.8.1 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio descrito por Prieto *et al.* (1999) é uma maneira simples e econômica de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas e suas frações. Possuindo a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante de componentes lipofílicos e hidrofílicos. O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28mL, 0,1mol/L) com solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (12mL, 0,03mol/L) e solução de H_2SO_4 (20mL, 3mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100mL com coloração amarela, quando ocorre à reação a cor torna-se verde (PRIETO *et al.* 1999). O extrato bruto e as frações para este estudo foram levados à secar em banho-maria (40°C), e a partir do material seco foram preparadas soluções metanólicas com concentração final de 200µg/mL. Destas, 0,3mL foram adicionadas a 3mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C, por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695nm, em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias, usando 0,3mL de metanol com 3mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200µg/mL) usada como padrão, e vitamina C (200µg/mL) usada como referência.

4.8.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH é um método aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade.

O DPPH é um radical estável, de cor violeta que possui absorção em 518 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método do DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos em curto período de tempo.

O potencial de redução do radical DPPH do extrato bruto e frações foram analisados espectrofotometricamente segundo MENSOR *et al.* (2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas das frações nas concentrações de 2,0 a 12,5 µg/mL, das quais 2,5 mL foram adicionados a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mol/mL. Para as frações hexano foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 300 µg/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 100 - \frac{(A \text{ amostra} - A \text{ branco}) \times 100}{A \text{ controle}}$$

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição, ou, algumas vezes, o estímulo da germinação e do crescimento de sementes de espécies silvestres ou de culturas.

Para esses testes foram utilizados os extratos brutos e frações. Os testes foram realizados em placas de petri colocadas no germinador Mangelsdorf (Biomatic). A espécie selecionada para este ensaio foi *Lactuca sativa*.

A escolha da espécie baseou-se na sua alta taxa de germinação e sensibilidade. Segundo Macias *et al.*, (2000), a utilização de espécies comerciais para os bioensaios tem como vantagem o fato dessas espécies serem geneticamente homogêneas, apresentarem germinação uniforme e estarem facilmente disponíveis; já as espécies silvestres são geneticamente mais heterogêneas que as cultivadas, e apresentam vários graus de sensibilidade para tratamento similar, além da germinação não ser uniforme.

Para o preparo das soluções o extrato bruto e as frações (FH, FCL, FAE e FRE) foram pesadas em balança analítica, e dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN *et al.*, 2000). Em seguida, estes foram diluídos em água destilada, obtendo-se a concentração de $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ sendo as concentrações de 500 e $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparadas por diluição. As soluções foram tamponadas com solução de MES (ácido 2-morfolinoetanossulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS *et al.*, 2000) com solução de KOH 0,1 N, utilizando-se pHmetro.

Para os bioensaios de germinação, aplicou-se a metodologia de Macias *et al.*, (2000). As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos, preparadas nas concentrações de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$, $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1.000\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, foram semeadas aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 30 diásporos da espécie *L. sativa*, distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (2009).

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), modelo Mangelsdorf (Biomatic) com condições de luz, umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante, conforme Brasil (1992).

4.9.1 Teste de germinação

A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, durante sete dias, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Após a contagem da germinação, o índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado através da fórmula proposta por MAGUIRE (1962), onde: $IVG = (G1/N1) + (G1/N2) + (Gn/Nn)$, onde “G” é o número de sementes germinadas e “N” é o número de dias da semeadura do 1ª até o sétimo dia de avaliação. A reposição de água, para evitar o ressecamento do substrato, foi feita pelas paredes das placas de petri, evitando-se a pulverização direta da água destilada sobre as sementes e substrato com conseqüente lavagem dos mesmos e carreamento temporário dos compostos bioativos para o fundo da caixa com possível alteração dos resultados.

4.9.2 Teste de Crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita MACIAS *et al.*, (2000). As sementes que germinaram, foram mantidas em BOD, nas mesmas condições especificadas anteriormente, e após sete dias, as plântulas foram congeladas durante 48 horas para bloquear o crescimento e, em seguida, mediu-se o alongamento da radícula (raiz primária) e do hipocótilo (caule primário), sendo medidas dez plântulas por placa, utilizando papel milimetrado.

4.10 ATIVIDADE SOBRE OS NEUTRÓFILOS HUMANO

Esse ensaio foi utilizada a técnica adaptada e modificada de Park, Fikrig e Smithwick (1968), Park e Good (1970), Levinsky *et al.* (1983), Markert, Andrews e Babior (1984) e Abreu *et al.* (2009). Este ensaio foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR dos projetos conforme o Anexo.

A amostra foi solubilizada em 1,0 mL de DMSO, e a partir dessa concentração inicial foram preparadas as soluções 2,5 – 5,0 – 10,0 e 15,0 µg/mL. Foram adicionadas em lâminas de vidro identificadas 50 µL da solução 48 h antes do ensaio e secas a temperatura ambiente. Para controle positivo utilizou-se 50 µL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) diluído a 10,0 µg mL⁻¹ em água destilada. Foram usados nesse ensaio dois controles negativos: o primeiro composto

por neutrófilos humanos sem tratamento com o NBT(Tetrazólio nitroble), e o segundo composto de neutrófilos humanos tratados com NBT. Este segundo controle negativo torna-se necessário para descartar a possibilidade de influência do NBT sobre a ativação dos neutrófilos. O ensaio iniciou-se com a adição de 36 mL de água destilada e 3mL de sangue humano (coletado no dia do ensaio com EDTA-Ácido etilenodiamino tetra-acético) em tubo cônico e homogeneização por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 12 mL de tampão PBS (salina tamponada com fosfatos, pH 7,2) concentrado 4 vezes e homogeneizou-se novamente durante 15 segundos para depois centrifugar por 10 min a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se, delicadamente, o sedimento em 3,0 mL de PBS normal. Em um tubo cônico, contendo 3mL de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade (Ficoll-Hypaque ® densidade 1,076), o sedimento ressuspendido foi adicionado e centrifugado por 25 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspendido em 3,0 mL de PBS normal. Nova centrifugação foi realizada por 10 min a 2000 rpm e o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS. A suspensão de células em PBS foi adicionada nas lâminas previamente preparadas, e incubada a 37° C em câmara úmida por 20 min. Após incubação, as placas foram lavadas 10 vezes com PBS (Salina tamponada com fosfatos) normal, adicionado 1 ou 2 gotas de corante NBT (3,2 mg/ mL-1 em PBS normal), com exceção da lâmina controle negativo sem NBT, e incubadas por 15 min a 37 ° C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas 5 vezes com PBS normal e secas à temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas foram coradas com safranina (preparada na proporção de 1:10 em água destilada a partir de uma solução etanólica a 2,5%, e filtrada por membrana milipore 0,22 µm), por 10 min e lavadas 3 vezes com água destilada e novamente secas à temperatura ambiente. Após o preparo, as lâminas foram examinadas ao microscópio, e presença de grânulos azuis no interior de todos os neutrófilos foi considerada como ativação. A amostra foi considerada ativadora de neutrófilos somente após apresentar resultado positivo em cinco ensaios distintos. Na Figura 7 temos a estrutura molecular do PMA, ativador de neutrófilos.

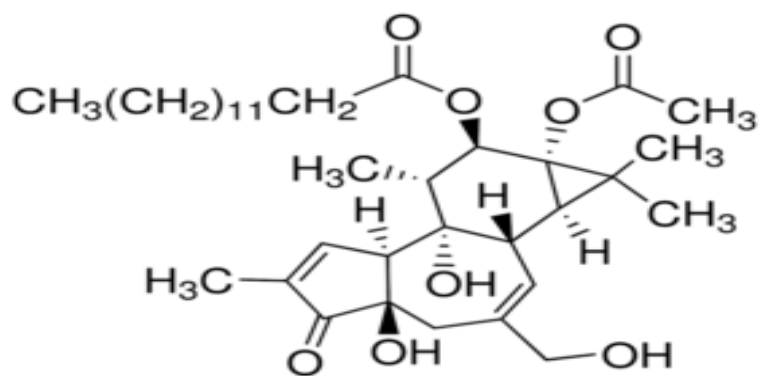


FIGURA 7 – ESTRUTURA MOLECULAR DO 12-MIRISTATO, 13-ACETATO DE FORBOL (PMA)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A finalidade desses parâmetros de qualidade como: perda por dessecação em estufa, teor de cinzas totais, teor de cinzas insolúveis e teor de sólidos do extrato bruto é de impedir reações de hidrólise, contaminação microbiana e além de reduzir volume e peso facilita a moagem do material (SIMÕES *et al.*, 2007). A perda por dessecação das frondes de *C. atrovirens*, neste estudo específico foi realizada em estufa em temperatura constante de 50°C e apresentou um teor de umidade abaixo de 14% que é o limite máximo recomendado para drogas vegetais (SIMÕES *et al.*, 1999).

A determinação do teor de cinzas permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis na droga vegetal como metais pesados, areia ou pedra, e é importante para o controle de qualidade da droga vegetal. Os valores encontrados nesta análise encontram-se dentro dos limites preconizados pela farmacopeia. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A Tabela 3 demonstra os valores obtidos como parâmetros físico-químicos das frondes de *C. atrovirens*.

TABELA 3 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL SECO E TRITURADO OBTIDO DAS FRONDES DE *C. atrovirens*

PARÂMETROS DE QUALIDADE	RESULTADOS OBTIDOS (MÉDIA ± DP)
PERDA POR DESSECAÇÃO EM ESTUFA	86,1375% ± 0,5573
TEOR DE CINZAS TOTAIS	5,8769% ± 0,1764
TEOR DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO	0,07 % ± 0,102
TEOR DE SÓLIDOS DO E.B	22,8636% ± 0,033
pH DO E.B	6,0
COLORAÇÃO DO E.B	Verde

5.2 PESQUISAS DE GRUPOS FITOQUÍMICOS

As Tabelas 4 e 5 apresentadas demonstram os resultados do ensaio sistemático qualitativo preliminar para a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários, que se encontram presentes na droga vegetal. Esta análise é fundamental como um guia para o isolamento de substâncias.

TABELA 4 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO A 20% DE *C. atrovirens*

ANÁLISES	EXTRATO AQUOSO
HETEROSÍDEOS ANTOCIÂNICOS	-
HETEROSÍDEOS SAPONÍNICOS	-
HETEROSÍDEOS CIANOGENÉTICOS	-
TANINOS HIDROLISÁVEIS	+
TANINOS CONDENSADOS	+
ÁCIDOS FIXOS	-
ÁCIDOS VOLÁTEIS	-
AMINO GRUPOS	+

NOTA: + = positivo - = negativo

Na Tabela 4, são apresentados os resultados da análise sistemática do extrato aquoso, e nesta análise foi verificada a presença de taninos hidrolisáveis, taninos condensados devido à cor verde obtida no resíduo do papel de filtro. Verificou-se também a presença dos aminogrupos, devido à coloração violácea. Heterosídeos antociânicos, saponinas, heterosídeos cianogenéticos, ácidos voláteis, ácidos fixos não foram encontrados.

TABELA 5 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20% DE *C. atrovirens*

GRUPOS FITOQUÍMICOS	ANÁLISES	FRAÇÃO HEXANO	FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	FRAÇÃO REMANESCENTE
ALCALOIDES	Reativo Mayer	-	-	-	-
	Reativo Dragendorff	-	-	-	-
	Reativo Bouchardat	-	-	-	-
	Reativo Bertrand	-	-	-	-
FLAVONOIDES	Leucoantocianidinas	-	-	+	+
	Heterosíd. flavônicos	-	-	-	-
	Oxálico bórico	+	+	+	+
	Pacheco	-	-	-	-
CUMARINAS	Tubo	-	-	-	-
	Papel	-	-	-	-
ANTRAQUINONA	Reação Bornträger	-	-	-	-
ESTEROIDES/ TRITERPENOS	Lieberman Bouchard	+	+	+	-
	KellerKelliani	+	+	+	-

Nota: + = positivo - = negativo

A indicação positiva da presença de leucoantocianidas e de flavonóides, indicando reação positiva especialmente para flavonóis, pois as flavanonas e isoflavonas não possuem esta propriedadee os derivados antociânicos coram-se, mas não produzem fluorescência.

Para esteróides e/ou triterpenos a reação de Libermann Bouchard indicou a presença de triterpenos nas frações hexano, clorofórmio e acetato de etila.

Na reação de Keller- Kelliani as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila obtiveram resultado positivo com coloração verde indicando a presença de triterpenos.

5.3 RENDIMENTO DO EXTRATO E FRAÇÕES

A partição do extrato bruto foi realizada a frio em funil de separação. Para obtenção das frações foram utilizados solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila), até a obtenção da fração remanescente.

No quadro abaixo está representado à quantidade das frações em grama e o rendimento em % em relação à quantidade de planta seca coletada.

Conforme os resultados demonstrados na Tabela 6, verificou-se quea fração acetato de etila teve um rendimento superior as demais frações, com 3.80 %, em

relação as demais. Esse maior rendimento deve-se ao alto teor de substâncias fenólicas presentes na espécie.

TABELA 6 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS A FRIO POR TURBÓLISE

FRAÇÃO	RENDIMENTO (g)	RENDIMENTO (%)
EXTRATO BRUTO	148,64	9,49%
HEXANO	4,95	3,62
CLOROFÓRMIO	4,01	2,93
ACETATO DE ETILA	5,19	3,80
REMANESCENTE	122,49	89,50

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOBRE *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada usada como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, e que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal(DL₅₀) (MEYER *et al.*, 1982).

Foi estabelecido segundo Meyer *et al.* (1982), uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL50, de extratos de plantas sobre microcrustáceos *Artemia Salina*, considerando que os valores acima de 1000 µg/mL e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos. Diversos trabalhos vêm tentando correlacionar a toxicidadesobre *Artemia Salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida.

Este bioensaio tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e tem sido utilizado na triagem de amostras para detecção simultânea de toxicidade efototoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

Para o cálculo da DL₅₀ os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico probitos. Nos resultados obtidos, foi observado que nenhuma das amostras testadas se mostrou tóxica para *A. salina*, uma vez que a DL₅₀ foi superior a 1000 µg/mL para todas as concentrações utilizadas, O controle feito com o solvente metanol não apresentou influência sobre os resultados, pois a mortalidade nos náupilos não foi observada, demonstrando não haver interferência

do solvente. Assim, é plausível inferir que *C. atrovirens* na forma de extrato não possui efeitos tóxicos no modelo apresentado.

TABELA 7 – MORTALIDADE DE *Artemia salina* e DL₅₀

AMOSTRAS	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO			DL ₅₀ (µg/mL)
	100 (µg/mL)	500 (µg/mL)	1000 (µg/mL)	
F. HEXANO	8	8	5	>1000
F. CLOROFÓRMIO	8	9	9	>1000
F. ACETATO DE ETILA	9	8	8	>1000
F.REMANESCENTE	9	7	7	>1000
EXTRATO BRUTO	8	9	9	>1000
CONTROLE NEGATIVO	1	0	0	>1000

Esses resultados quando comparados aos obtidos na atividade hemolítica demonstram a ausência de toxicidade. Para uma confirmação seria adequado a realização de estudos toxicológicos em outros modelos farmacológicos, uma vez que a presença de atividade antioxidante nesta espécie impulsiona a continuidade em pesquisas para a validação dessa atividade *in vivo*.

5.5 ATIVIDADE HEMOLITICA

A hemólise é caracterizada por ruptura do eritrócito com liberação de hemoglobina. A hemoglobina livre no plasma é prejudicial à saúde causando sérios danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração, sendo necessário dessa maneira a observação da referida atividade (CARVALHO *et al.*, 2007). Nesse sentido na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais, faz-se necessária a verificação da atividade hemolítica da espécie estudada.

Os resultados obtidos neste ensaio demonstram que o extrato bruto e frações não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas (Tabela 8). Ensaio de toxicidade preliminar funcionam como uma ótima ferramenta nos estudos com plantas medicinais e devem ser implementados, pois auxiliam na diminuição do uso de animais na experimentação o que vem sendo uma

preocupação dos comitês de ética em experimentação animal (BEDNARCZUK *et al*, 2010).

TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HEMÓLISE DE *C. atrovirens*

AMOSTRA	100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
E.B.	0.057 a1	0.069 a2	0.077 a2
FHE	0.056 a1	0.070 a2	0.116 a3
FCL	0.049 a1	0.069 a2	0.102 a3
FAE	0.052 a1	0.077 a2	0.122 a3
FR	0.049 a1	0.075 a2	0.085 a2
C. POSITIVO		0.453 a5	

NOTA:(1) EB (Extrato Bruto); FHE (Fração Hexano); FCL (Fração Clorofórmio); FAE (Fração Acetato de Etila) E FR (Fração Remanescente)

(2) MÉDIAS SEGUIDAS DE MESMA LETRA NÃO SE DIFEREM ENTRE SI PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ($p < 0,05$)

Na tabela 8 temos a análise estatística pelo Teste de Scott- Knott, onde podemos observar que não apresentou atividade hemolítica observando que todas amostras testadas diferem estatisticamente do controle positivo, assim não apresentando hemólise.

A Figura 8 demonstra o ensaio de atividade hemolítica do extrato bruto com resultado negativo formando o *pellet* de eritrócitos na concentração de 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, onde podemos comparar com o controle positivo onde houve o rompimento dos eritrócitos.

Testes detoxicidade preliminar funcionam como uma ótima ferramenta nos estudos com plantas medicinais, pois auxiliam na diminuição do uso de animais na experimentação o que vem sendo uma preocupação dos Comitês de ética em experimentação animal (BEDNARCZUK *et al.*, 2010, p. 48)

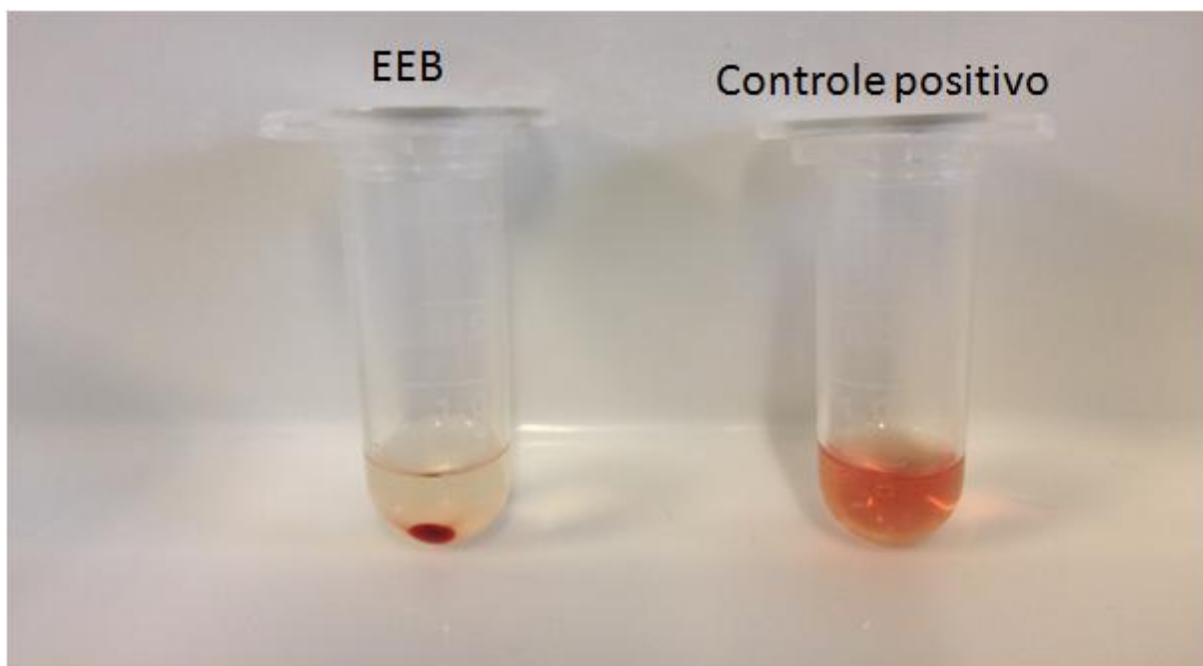


FIGURA 8 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO DE *Cyathea atrovirens*

FONTE: A autora (2014)

5.6 DOSAGENS DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

A dosagem de polifenóis pelo método de FolinCiocalteau, baseia-se na redução de óxidos metálicos formando coloração azul. A intensidade de absorção de luz nesse comprimento de onda é proporcional à concentração de fenóis, onde foi realizada a leitura a 765 nm.

Após obterem-se as absorbâncias e a média destas para cada concentração de cada amostra, e utilizando a equação da curva padrão de ácido gálico, foi possível determinar a concentração de substâncias fenólicas correspondentes ao ácido gálico das amostras. A Figura 9 mostra o resultado so ensaio.

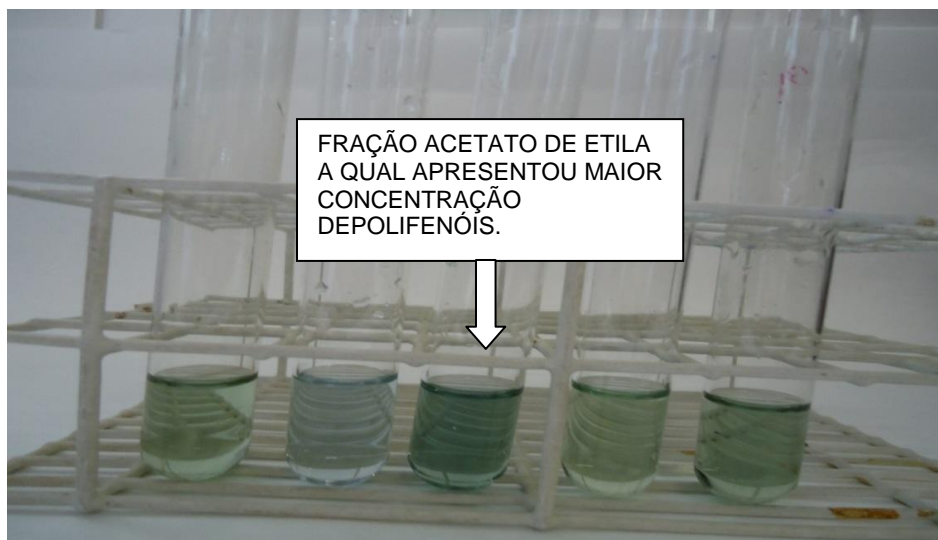


FIGURA 9 – REAÇÃO PARA POLIFENÓIS DO EXTRATO E FRAÇÕES DE *C. atrovirens*, PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU. A COLORAÇÃO AZUL, INDICA A PRESENÇA DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

FONTE: A autora (2014)

Conforme observado na Tabela 9, a concentração de fenóis totais variou em função da polaridade do solvente utilizado no fracionamento. A fração acetato de etila apresentou maior conteúdo de fenóis quando comparadas as demais frações (512,71mg/g), seguida pela fração clorofórmio (232,95mg/g) e fração remanescente (197,24mg/g) e extrato bruto (185,99mg/g). Um menor conteúdo de substâncias fenólicas foi observado para a fração hexano (131,36mg/g), uma vez que a menor polaridade deste solvente faz com que este tenha pouca afinidade com substâncias fenólicas. Os resultados referentes à coloração azul, indicando a presença de substâncias fenólicas, é demonstrada na Figura 9.

Os polifenóis são um grupo muito estudado em plantas por possuírem atividade farmacológica de interesse, também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEM *et al.*, 1992), além de contribuírem com adstringência e coloração. São substâncias redutoras e, portanto, oxidam-se com facilidade, resultando em substâncias coradas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Estes resultados tornam-se importantes, quando se avalia a capacidade de substâncias fenólicas, uma vez que *in vitro*, este pode estar relacionado à capacidade antioxidante, e esta pode variar não somente em função da sua estrutura química, mas também devido à polaridade do solvente empregado para sua extração (MOURE *et al.*, 2001).

Esses resultados são semelhantes obtidos por BEDNARCKZUK *et al.* (2010), de uma samambaia, *Dicksonia sellowiana*, onde a fração acetato de etila teve maior concentração de polifenóis.

Os resultados foram dados em mg/g de polifenóis do extrato bruto e frações.

TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS EM mg/g DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

AMOSTRA	mg/g EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO
EXTRATO BRUTO	185,99
FRAÇÃO HEXANO	131,36
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	232,95
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	512,71
FRAÇÃO REMANESCENTE	197,24

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante está relacionada com substâncias capazes de proteger um sistema biológico contra efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de oxigênio (ARNAO, 2000). Um antioxidante biológico é definido como qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato (BENZIE, 1996). São substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados à célula pelas espécies reativas de oxigênio (ANDRADE *et al.*, 2007).

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI *et al.*, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. E diante deste contexto foram realizados ensaios com duas metodologias para verificar a ação do extrato bruto e frações em diferentes sistemas.

Diversas doenças têm sido relacionadas com os radicais livres que oxidam por possuir elétrons de valência desemparelhados. Esses radicais livres podem ser

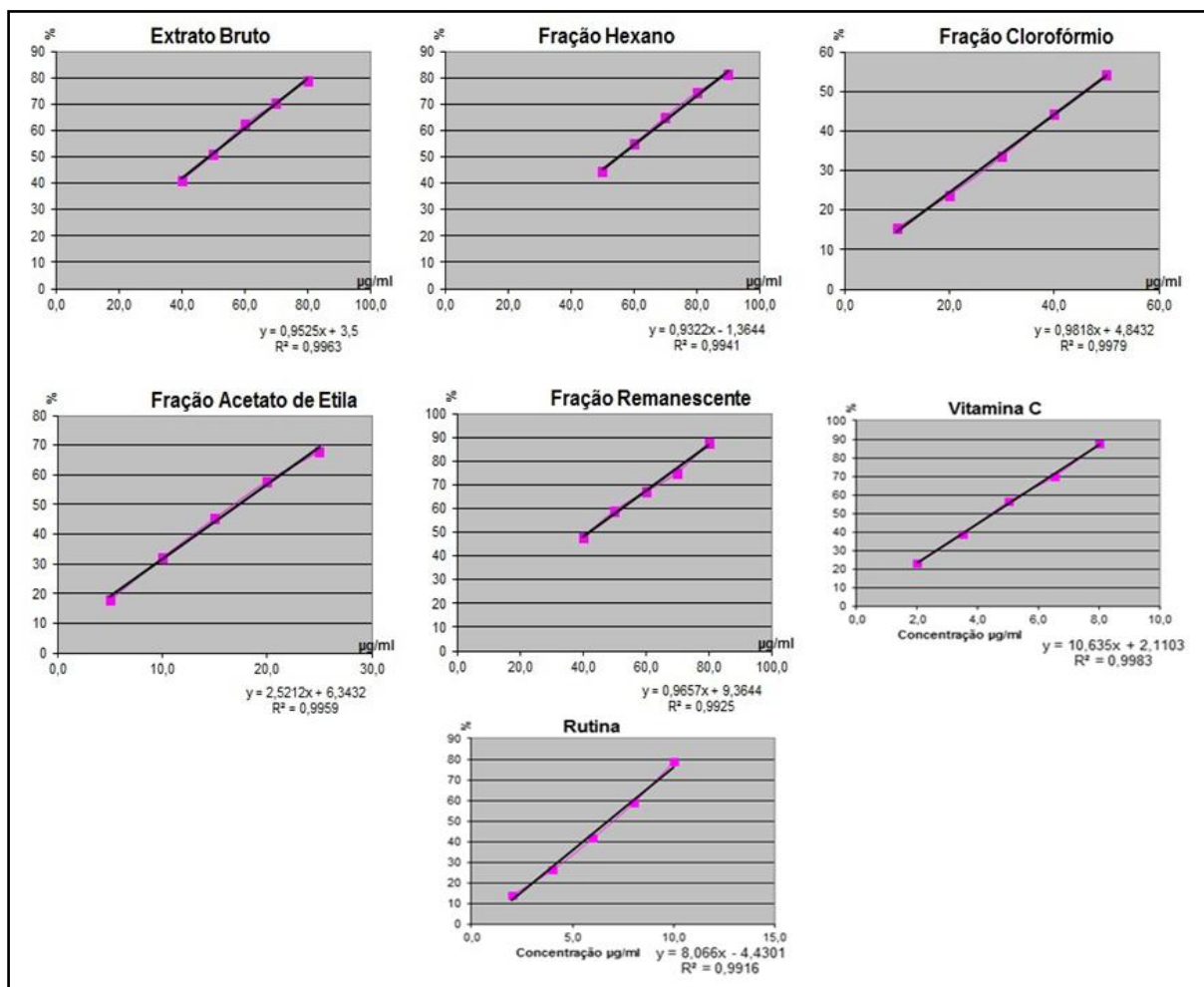
gerados intrinsicamente pelo próprio metabolismo por meio do processo de combustão do oxigênio e também através de fatores extrínsecos como cigarro álcool, poluição ambiental entre outros (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

5.7.1 Avaliação da Atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Para cada amostra testada foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC_{50} , ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Cada amostra foi comparada com os padrões de vitamina C e rutina. A figura 10 apresenta as retas das médias obtidas para o extrato bruto e frações demonstrando os pontos das concentrações utilizadas para cada amostra com sua respectiva porcentagem de atividade antioxidante do Ensaio pela Redução do Radical DPPH.

Os gráficos na figura 10, apresentam os 5 pontos das concentrações utilizadas para cada amostra com sua respectiva porcentagem de atividade antioxidante do Ensaio pela Redução do Radical DPPH, através dos pontos foi adicionado a linha de tendência e a equação de cada gráfico foi proposta para o cálculo do IC_{50} .

FIGURA 10 – CURVAS OBTIDAS PARA O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA, REMANESCENTE, E PADRÕES VITAMINA C E RUTINA.



Para a rutina as concentrações utilizadas variaram de 2 a 10 µg/mL, e para a vitamina C, os valores foram de 1,6 a 8 µg/mL. Para o extrato bruto e fração remanescente, as concentrações ativas na redução do DPPH foram de 40 a 80 µg/mL. Com o aumento da polaridade das frações obtidas (substâncias com caráter mais hidrofílico) foram observados resultados mais favoráveis, ou seja, as concentrações (µg/mL) necessárias para redução do DPPH foram menores. A fração hexano (foram observadas as concentrações mais altas (50 a 90 µg/mL), indicando menor atividade antioxidante desta amostra, quando avaliada a capacidade de redução do DPPH. A fração acetato de etila apresentou maior capacidade antioxidante frente o radical DPPH, onde as concentrações variaram entre 4,5 a 25 µg/mL.

A atividade antioxidante de cada amostra foi calculada em relação à vitamina C e à rutina, sendo para cada padrão consideradas como 100% de atividade. Os resultados são demonstrados na Tabela 10. De acordo com a análise estatística dos dados, verificou-se que o extrato e frações diferem dos padrões utilizados. Entre as amostras testadas da espécie *C. atrovirens*, a fração acetato de etila foi a que apresentou menor valor de IC₅₀ (17.31µg/ml), indicando uma maior atividade antioxidante em relação às demais.

Quando os valores obtidos de IC₅₀ para cada amostra foram comparados, pode-se observar que todas as amostras apresentaram resultados estatisticamente diferentes dos padrões utilizados (vitamina C e rutina). Entretanto, as frações hexano, apresentaram menor atividade na redução do DPPH, sendo os valores de IC₅₀ os mais altos, ou seja, maiores quantidades de amostra são necessárias para obtenção da atividade desejada.

TABELA 10 – RESULTADOS DE IC₅₀ E DO TESTE DE TUKEY PARA REDUÇÃO DO DPPH

AMOSTRA	IC ₅₀ (µg/mL) ± DP	TESTE DE TUKEY
VITAMINA C	4,47 ± 0,029501	a1
RUTINA	5,65 ± 0,158521	a2
EXTRATO BRUTO	48,82 ± 0,135031	a3
F. HEXANO	55,08 ± 0,770541	a4
F. CLOROFÓRMIO	45,98 ± 0,450148	a5
F. ACETATO DE ETILA	17,31 ± 0,370045	a6
F. REMANESCENTE	42,08 ± 0,300056	a7

As diferenças na atividade antioxidante do extrato e frações de *C. atrovirens*, podem ser observadas na Figura 11, onde a coloração violeta, indica uma menor atividade antioxidante, e a coloração amarela, o aumento da atividade antioxidante frente ao radical DPPH.

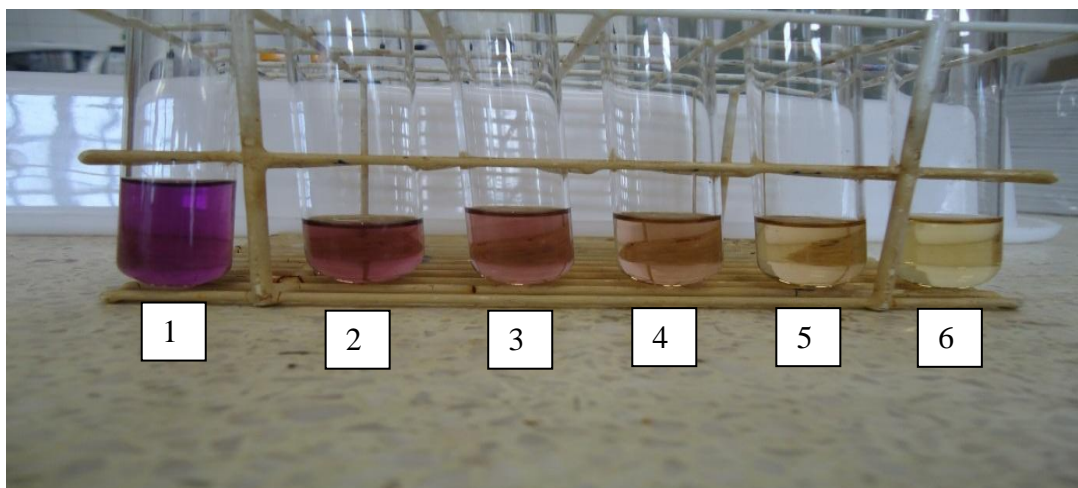


FIGURA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE DE *Cyathea atrovirens*.

NOTA: TUBO 1 – CONTROLE DPPH; 2 – FRAÇÃO HEXANO; 3- EXTRATO BRUTO; 4- FRAÇÃO REMANESCENTE; 5 – FRAÇÃO CLOROFÓRMIO; 6 FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

FONTE: A autora (2014)

5.7.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método fosfomolibdênio

Este método fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) que na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, ocorre a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm. A atividade antioxidante das amostras para este estudo foi calculada em relação à vitamina C e à rutina, atividades consideradas 100% nesse modelo como atividade antioxidante. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11. No ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio, nenhuma das amostras apresentou capacidade antioxidante semelhante à rutina e vitamina C. Um maior percentual antioxidante foi observado para a fração acetato de etila (77,23%), quando comparada à rutina. As outras frações não apresentaram atividade antioxidante igual a 50%, quando comparadas aos padrões rutina e vitamina C.

TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO A RUTINA (%)	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO A VITAMINA C (%)
EXTRATO BRUTO	35,64	14,59
FRAÇÃO HEXANO	31,80	13,01
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	44,25	18,11
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	77,23	31,82
FRAÇÃO REMANESCENTE	34,54	14,14

As diferenças nas absorvâncias podem ser observadas na Figura 12, onde o aumento da coloração azul indica maior capacidade antioxidante, para cada amostra testada.

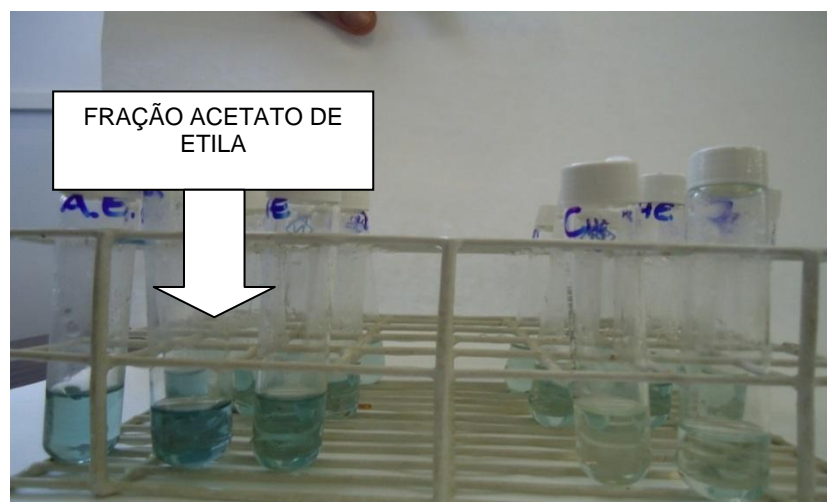


FIGURA 12 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES, PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.

FONTE: A autora (2014)

A fração acetato de etila apresenta potencial antioxidante, verificado pela presença de substâncias com capacidade redutora, identificados nos dois ensaios antioxidantes testados. Esta atividade antioxidante pode estar relacionada ao conteúdo de substâncias fenólicas nesta fração. Entretanto maiores estudos devem ser feitos para elucidar o mecanismo de ação e a biodisponibilidade das substâncias fenólicas presentes nesta fração. Sun *et al* (2002) e Chinnici *et al.* (2004) encontraram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e o conteúdo de polifenóis totais. Dessa forma, é evidenciado que a atividade antioxidante da fração

acetato de etila pode estar relacionada a presença de substâncias fenólicas nesta fração.

Alguns estudos demonstraram que substâncias oxidantes são causadoras de diversas doenças degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, neurológicas e algumas formas de câncer (PRIOR *et al.*, 1998; ARUOMA, 1998; LAI; CHOU; CHAO, 2001). Os antioxidantes presentes em plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (WANG; LIN, 2000) e a maioria de seus efeitos biologicamente ativos são derivados das funções antioxidantes (VELIOGLO *et al.*, 1998). Os resultados podem ser visualizados pelos Gráficos 2 e 3.

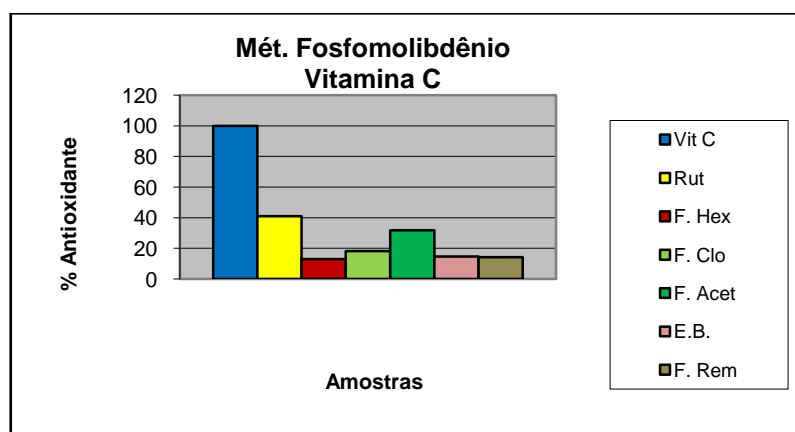


GRÁFICO 1 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Cyathea atrovirens* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A VITAMINA C

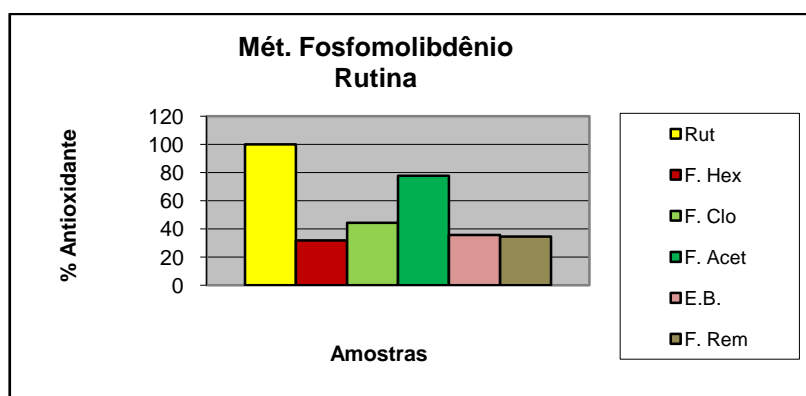


GRÁFICO 2 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Cyathea atrovirens* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO COMPARADA A RUTINA

5.8 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

5.8.1 Efeitos sobre a germinação

A análise dos resultados sobre a influência do extrato bruto e frações de *C. atrovirens*, mostram que apenas a concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato bruto, fração clorofórmio e remanescente, e a concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração hexano afetaram a velocidade de germinação. O extrato bruto e fração remanescente estimularam a germinação de *Lactuca sativa* em relação ao controle.

A fração hexano e clorofórmio atrasaram a germinação das sementes de *L. sativa*. Assim, é plausível sugerir que substâncias de baixa polaridade podem estar envolvidas. O ensaio sistemático de análise fitoquímica demonstrou a presença de triterpenos na fração hexano e clorofórmio (Tabela 5).

Os terpenoides constituem importante classe de substâncias envolvidas em diferentes tipos de atividades biológicas; os monoterpenos e sesquiterpenos são os terpenoides mais envolvidos em alelopatia (ABRAHIM *et al.*, 2000). Embora muitos estudos relacionem triterpenos com fortes atividades alelopáticas (LOTINAHENSENET *et al.*, 1992; FISCHER *et al.*, 1994), outros apresentam essa classe de substâncias com pouca atividade inibitória. Macias *et al* (1997) isolaram e identificaram 11 triterpenos de frações bioativas da parte aérea de *Melilotus messanensis*, à semelhança das respostas encontradas neste trabalho, constataram que o efeito global dos triterpenos sobre *Lactuca sativa*, nos parâmetros germinação e desenvolvimento inicial, foi abaixo de 10% de inibição. Santos *et al* (2008) observaram também baixa atividade alelopática de dois triterpenos pentacíclicos (fridelina e epifridelinol) sobre germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas das espécies malícia e mata-pasto.

TABELA 12 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE *L. sativa* SUBMETIDAS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO, FRAÇÃO HEXANO, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E FRAÇÃO REMANESCENTE DE *C. atrovirens*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA ($\mu\text{g/mL}$)	IVG
EXTRATO BRUTO	250	21,850a2
	500	22,021a2
	1000	22,838a3
F. HEXANO	250	20,508a2
	500	21,979a1
	1000	18,438a2
F. CLOROFÓRMIO	250	19,200a2
	500	20,650a2
	1000	18,058a1
F. ACETATO DE ETILA	250	21,579a2
	500	21,371 a2
	1000	22,000a2
F. REMANESCENTE	250	23,708a3
	500	23,125a2
	1000	21,113a2
CONTROLE	-	22,000a2

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott- Nott a 5% de probabilidade

5.8.2 Avaliação do crescimento

Nos ensaios de crescimento, foi verificado que a atividade alelopática variou em função da concentração das frações utilizadas. No crescimento da raiz primária foi observado que o extrato bruto e fração acetato de etila nas concentrações de 250e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração hexano, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração clorofórmio, e as concentrações de 250e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, provocaram estímulo da raiz primária (Gráfico 4). Maior estímulo foi verificado para o extrato bruto (27,2%- 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e fração acetato de etila (27,5%- 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Inibição da raiz também foi observada para a concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da fração clorofórmio (18,8%) e remanescente (7,7%). Entretanto, os efeitos inibitórios foram menos intenso, quando comparados aos efeitos de estímulo (Gráfico 4).

Nos resultados obtidos para o crescimento do hipocótilo, foi verificado que efeitos inibitórios não foram observados. A concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ estimulou o crescimento do hipocótilo em *L. sativa*, submetidas ao extrato bruto e frações. Efeitos mais intensos foram observados para a fração hexano, demonstrando que possivelmente, substâncias de baixa polaridade podem estar envolvidas com a atividade alelopática (Gráfico 5).

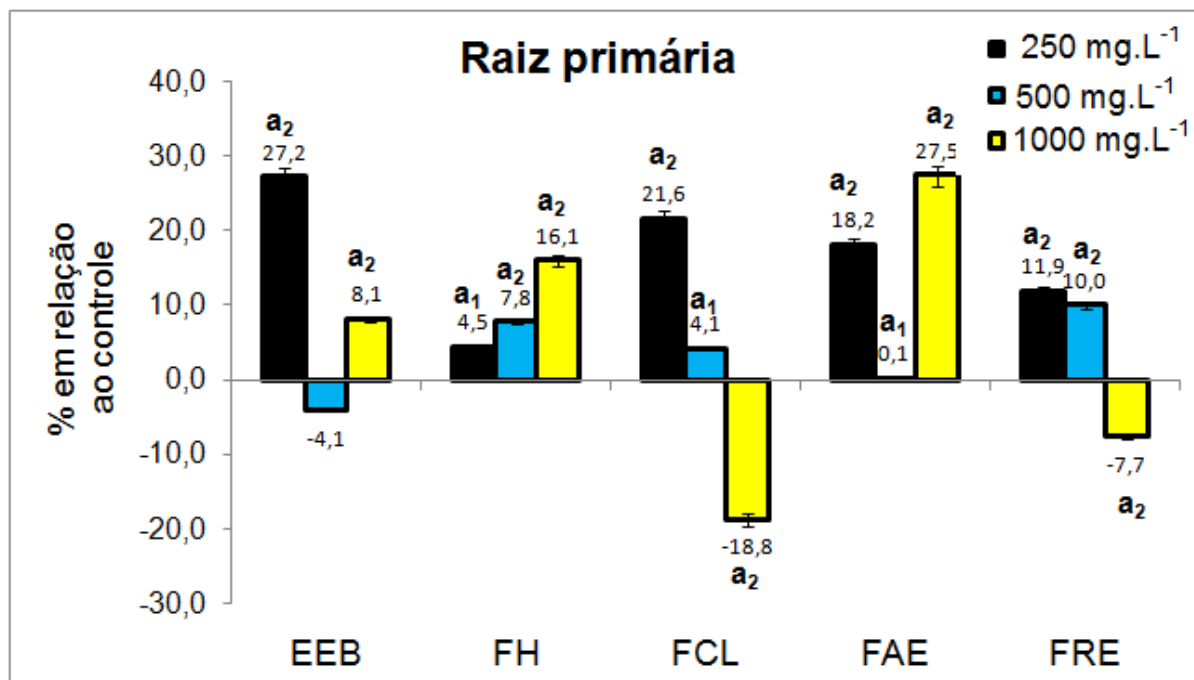


GRÁFICO 3 – CRESCIMENTO MÉDIO DA RAIZ DE PLÂNTULAS DE *L. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÕES HEXANO (FH), CLOROFÓRMIO (FCL) ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FRE) DE *Cyathea atrovirens*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE SKOTT- KNOTT.

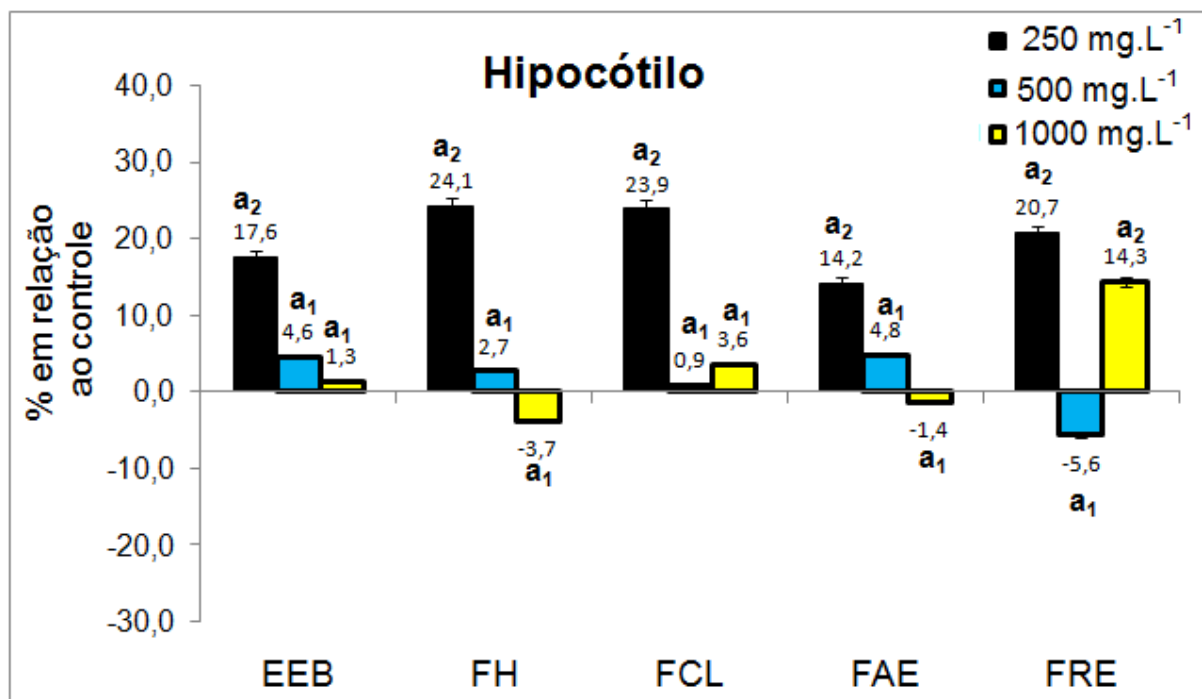


GRÁFICO 4 – CRESCIMENTO MÉDIO DA RAIZ DE PLÂNTULAS DE *Del. sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB), FRAÇÕES HEXANO (FH), CLOROFÓRMIO (FCL) ACETATO DE ETILA (FAE) E REMANESCENTE (FRE) DE *Cyathea atrovirens*. DADOS EXPRESSOS EM PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO CONTROLE. *A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0,05$) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE, PELO TESTE DE SKOTT- KNOTT.

5.9 ATIVIDADES SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Para esse ensaio, foram realizados cinco repetições como extrato bruto de *Cyathea atrovirens*, por ser um ensaio onde é usado sangue humano, realizamos uma preliminar com o extrato bruto para avaliar a ativação ou não dos neutrófilos e posteriormente depois de confirmada essa ativação realizar com as frações e isolados. O resultado é apresentado em ativação ou não ativação dos neutrófilos na Tabela 12.

TABELA 13 – ATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE *Cyathea atrovirens* SOBRE NEUTRÓFILOS HUMANOS

AMOSTRA	CONTROLES			CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	SNBT	CNBT	PMA	2,5	5,0	10,0	15,0
EXTRATO BRUTO	-	-	+	+	+	+	+

NOTA: SNBT = sem NBT; CNBT = com NBT; (-) = ativação negativa; (+) = ativação positiva

O PMA é um éster de forbol, análogo do dialciliglicerol, muito utilizado como controle positivo de ativação de neutrófilos. Os ésteres de forbol são produtos naturais isolados de *Croton tiglium* e de outras plantas da família Euphorbiaceae. Eles são encontrados nas sementes dessa planta e são os principais produtos obtidos da extração do óleo das sementes de cróton. Os ésteres de forbol, sobretudo o PMA, são os responsáveis pelas características tóxicas das sementes e óleo de cróton (GLABER *et al*, 1993).

As Figuras 14 a 16 mostram os controles utilizados e as Figuras 17 a 20 as concentrações de 2,5 , 5,0 , 10,0 e 15,0, respectivamente, ativando os neutrófilos, com a liberação dos grânulos azuis.

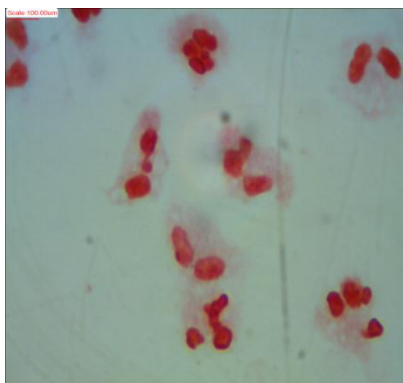


FIGURA 13 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA SOMENTE COM NBT, SEM A FORMAÇÃO DE GRÂNULOS AZUIS

FONTE: A autora (2014)



FIGURA 14 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DO CONTROLE NEGATIVO SEM TRATAMENTO

FONTE: A autora (2014)

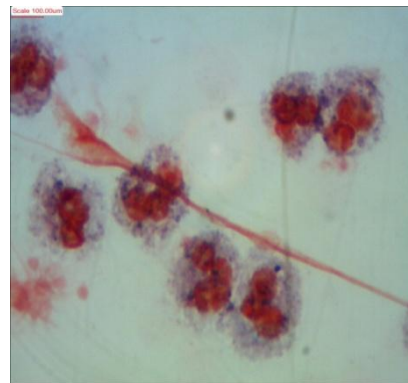


FIGURA 15 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA DO CONTROLE POSITIVO (PMA)

FONTE: A autora (2014)

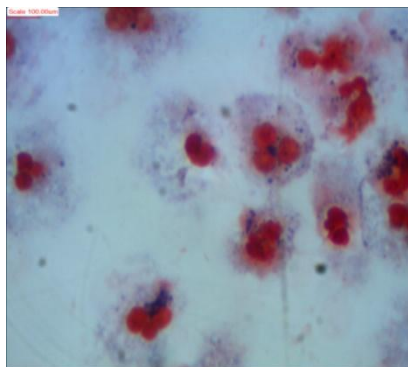


FIGURA 16 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 2,5 µg/mL DA AMOSTRA

FONTE: A autora (2014)

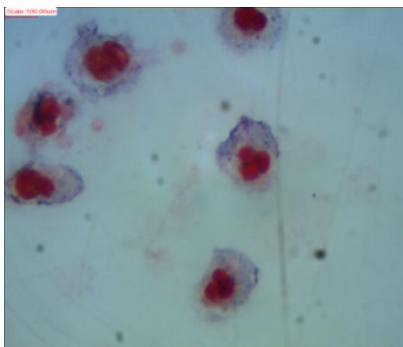


FIGURA 17 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 5 µg/mL DA AMOSTRA

FONTE: A autora (2014)

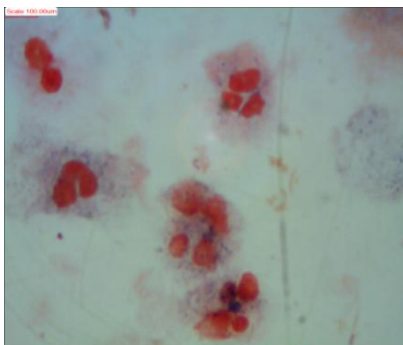


FIGURA 18 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 10 µg/mL DA AMOSTRA

FONTE: A autora (2014)

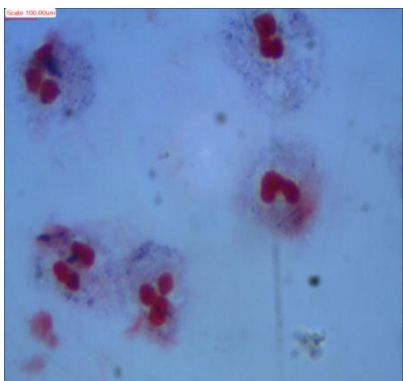


FIGURA 19 – FOTOMICROSCOPIA DA LÂMINA MOSTRANDO GRÂNULOS AZUIS DE FORMAZAN, INDICANDO ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS COM UMA SOLUÇÃO DE 15 µg/mL DA AMOSTRA

FONTE: A autora (2014)

Para avaliação dessa atividade, para a amostra testada que foi o extrato bruto de *Cyathea atrovirens*, foram realizados cinco repetições para verificar a ativação dos neutrófilos. De acordo com o ensaio realizado, o extrato bruto de *C. atrovirens* foi capaz de ativar os neutrófilos nas quatro concentrações testadas apresentando resultados semelhantes ao controle PMA diluído a 10µg mL.

Sendo assim, pode-se supor que o extrato bruto testado possui propriedades semelhantes ao PMA frente aos neutrófilos humanos.

5 CONCLUSÃO

A presente dissertação teve como objetivo contribuir para o estudo fitoquímico da espécie *Cyathea atrovirens*, Cyatheaceae, com o objetivo de verificar as atividades biológicas da espécie estudada, bem como determinar a sua composição química, possuindo: aminogrupos, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, flavonóides e triterpenos. A partir das frondes coletadas em Piçarras, localizado no Estado de Santa Catarina, foi preparado o extrato etanólico bruto, foi particionado por coeficiente de polaridade.

Na atividade hemolítica e toxicidade frente à *Artemia salina*, ensaios toxicológicos testados com o extrato bruto e frações de *Cyathea atrovirens* não apresentaram atividade, pois não demonstraram formação de coloração avermelhada e frente *Artemia salina* as amostras apresentaram um valor de DL₅₀ superior a 1000 µg/mL, mostrando ausência de toxicidade. Estes resultados indicam a possível aplicação do extrato e frações na área cosmética, visto que os mesmos não se mostraram tóxicos pelos modelos testados, existindo a possibilidade do desenvolvimento de formulações cosméticas com propriedades antioxidantes e emolientes.

O estudo da atividade antioxidante empregados pelos métodos DPPH e complexo fosfomolibdênio demonstram a alta capacidade no sequestro de radicais livres, e esta propriedade pode estar relacionada à presença de substâncias fenólicas nessa fração. A fração acetato de etila foi a que apresentou melhor resultado nos modelos testados, possivelmente devido ao teor de polifenóis dessas amostras verificadas através do método Folin-Ciocalteu.

Nos ensaios de atividade alelopática, foi verificado que o extrato bruto e frações afetam o desenvolvimento das plântulas de *Lactuca sativa*, inibindo ou estimulando de forma geral a germinação e o crescimento.

Estes efeitos podem ser resultantes da presença de substâncias fenólicas no extrato bruto e fração acetato de etila, provocando efeitos de estímulo.

No crescimento da raiz primária e hipocótilo, e acúmulo de substâncias de baixa massa molecular como esteróides na fração hexano, tal como indicado pelo ensaio sistemático, ou ainda triterpenos que são comuns nessa fração, inibindo o crescimento da raiz primária e estimulando o crescimento do hipocótilo, onde a

redução acentuada da raiz pode afetar a capacidade competitiva e a produtividade da planta enquanto o estímulo da parte aérea pode levar a planta ao estiolamento, podendo afetar o xilema.

No teste sobre neutrófilos humanos o extrato bruto de *Cyathea atrovirens*, obteve uma expressiva ativação dos neutrófilos comparado ao PMA, utilizado como controle positivo, onde todas as concentrações teve resultado positivo, ativando os neutrófilos.

Todos esses resultados somam para a busca de outras atividades biológicas das amostras testadas, principalmente da fração acetato de etila pelo seu potencial antioxidante e identificação dos compostos dessa fração em especial.

REFERÊNCIAS

ABRAHIM, D *et al.* Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth and mitochondrial respiration of maize. **J. Chem. Ecol.**, v. 6, n. 3, p. 611-624, 2000.

ANDRADE, C. A., *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.231-235, 2007.

ARENS, N. C. Variation in performance of the tree fern *Cyathea caracasana* (Cyatheaceae) across a successional mosaic in Andean cloud forest. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 545-551, 2001.

ARNAO M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Sci Tech**, 2000;11(11):419-21.

AZEVEDO, F.; DROSTE, A.; WINDISCH, P. Aspectos da germinação de esporos e desenvolvimento da fase gametofítica de *Alsophila setosa* Kaulf. e *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae). Pesquisas – **Botânica**, v. 59, n. 1, p. 223-236, 2008.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BEDNARCZUK, V.O; VERDAM, M.C.S; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica. **Visão Acadêmica**. V.11 (2), p.43-50, 2010.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BERNABE, N.; WILLIAMS-LINERA, G.; PALACIOS-RIOS, M. Tree ferns in the interior and at the edge of a Mexican cloud forest remnant: spore germination and sporophyte survival and establishment. **Biotropica**, v. 31, n. 1, p. 83-88, 1999.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, 2º Ed. Brasília, 2009.

CARVALHO *et al.* Efeito da bomba de infusão de soluções sobre os graus de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n. 2. 149-152, 2007.

CHINNICI, F. et al. Radical Scavenging Sctivities of Seels and Sulps from cv. Golden Delicious Apples as Related to their Phenolic Composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4684-4684, 2004.

CHIOU, W. L.; LIN, J. C.; WANG, J. Phenology of *Cibotium taiwanense* Cyatheaceae (Pteridophyta) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Tese de Doutorado**.

DALL'STELLA, D. S. G.; Estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) e de suas ações antibacteriana, antifúngica, alelopática, antioxidante e toxicológica. Curitiba, 2008. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G & DUKE, S.O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26 n. 9, p.2079-2093, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. Brasília: **ANVISA**, 2010.

FERNANDES, I. 1997. Taxonomia e fitogeografia de Cyatheaceae nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. São Paulo. 435 f. **Tese** (Doutorado em Botânica). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

FERNANDES, I. 2003. Taxonomia dos representantes de Cyatheaceae do nordeste oriental do Brasil. **Pesquisas Botânica**, 53:7-53

FISCHER, N. H. *et al.* In research of allelopathy in the Florida scrubs: the role of terpenoids. **J. Chem. Ecol.** v. 20, n. 6, p. 1355-1358, 1994.

FLORA DO BRASIL, Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB90866>>. Acesso em: 28 Jan. 2014.

HERBARIO. Plantas medicinais e aromáticas. Disponível em <www.herbario.com.br>. Acesso em: 10 nov. 2013

HIRAOKA A, MAEDA M. A new acylated flavonol glycoside from *Cyathea contaminans* Copel. and its distribution in the Pterophyta. *Chem Pharm Bull* 1979;27:3130 – 6.

HIRAOKA A, HASEGAWA M. Flavonoid glycosides from five *Cyathea* species. *Bot Mag Tokio* 1975;88:127–30.

HOSHIZAKI, B. J. *Fern Growers Manual*. New York: Alfred A. Knopf, 1979, p. 100-103.

JOLY, A. B.; **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Ed. Nacional, p.173-174. 1985.

LELLINGER, D. B. 1987. The disposition of *Trichipteris* (Cyatheaceae). *Amer. Fern Jour.* 77 (3): 90-94.

LORSCHUITTER, M. L. *et al.* Pteridophyte spores of Rio Grande do Sul flora, Brazil. Part I. **Palaeontographica**, v. 246, n. 1-3, p. 1-113, 1998.

LORSCHUITTER, M.L.; ASHRAF, A. R.; WINDISCH, P. G. & MOSBRUGGER, V. 1999. Pteridophyte spores of Rio Grande do Sul flora, Brazil. Part II. **Palaeontographica**, 251(1): 71-235.

LEHN, C. R.; LEUCHTENBERGER, C. Resistência ao fogo em uma população de *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) no Estado do Rio Grande do Sul Brasil. **Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 15-21, 2008.

LORENZI, T.F. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

LOTINA-HENSEN, B. *et al.* Inhibition of oxygen evolution by Zanzanin-C. **J. Chem. Ecol.**, v. 18, n. 11, p. 1891-1990, 1992.

MACIAS, V. E. V.; COY, E. D. B.; CUCA, L. E. Novel furocarbazole alkaloids and antibacterial activity of ethanol extract from *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 39, n. 3, 2010.

MACIAS, F.A., CASTELLANO, D., MOLINILLO, J.M.G. Search for a standart phytotoxic biossay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**.v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACIAS, F. A.; SIMONET, A. M.; GALINDO, J. C. G. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. **J. Chem. Ecol.**, v. 23, n. 7, p. 376-382 1997.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 1, p.176-177, 1962.

MARKERT, M.; ANDREWS, P.C.; BABIOR, B.M. Measurement of O₂- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 358-365, 1984.

MEHLTRETER, K.; GARCÍA-FRANCO, J. G. Leaf Phenology and Trunk Growth of the Deciduous Tree Fern *Alsophila firma* (Baker) D. S. Conant in a Lower Montane Mexican Forest. **American Fern Journal**, n. 98, v. 1, p. 1-13, 2008.

MENSOR L. L.; MENEZES F. S.; LEITÃO G. G.; REIS A. S.; SANTOS T. C.; COUBE C. S. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. V. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MEYER, B. N., *et al.*; Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MOURE, A. *et al.* Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

NAGEM, T.J., Da SILVA, M. C.; Da SILVEIRA, J.C. (1992). Clathraxanthone, a 1,2,7-trioxygenated xanthone from *Haploclathra paniculata*. *Phytochemistry. The International Journal of Plant Biochemistry*, 31, 2913-2914.

MEYER, B. N., *et al.*; Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v.45, p.31-34, 1982.

OLSEN, SUE.; Encyclopedia of Garden Ferns. **Port Land**, Oregon. Estados Unidos. Editora Timber Press. p. 26, 27, 201. 2007.

PAGE, C. N. The Diversity of Ferns. An Ecological Perspective. In: DYER, A. F. The Experimental Biology of Ferns. London: **Academic Press**, 1979, p. 10-53.

PONCE, M. Pteridophyta. In ZULOAGA, FO. e MORRONE, O. (Eds.). Catálogo de las plantas vasculares de Argentina I: Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae (Monocotyledoneae). v. 60. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 1996, p. 1-79.

PARK, B.H.; FIKRIG, S.M.; SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. **The Lancet**, p. 532-534, 1968.

PARK, B.H.; GOOD, R.A. N.B.T. test stimulated. The Lancet, p. 616, 1970. particles from human neutrophils. **Methods in Enzymology**, v.105, p. 358-365, 1984.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

RECHENMACHER, C.; SCHMITT, J. L.; DROSTE, A. Spore germination and gametophyte development of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) under different pH conditions. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1155-1160, 2010.

SANT'ANNA, J. R.; MIGUEL, O. G.; ALQUINI, Y. Estudo morfo-anatômico de *Trichipteris atrovirens* (Langsd. et Fisch.) Tryon. (Cyatheaceae). **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 59-64, 2001.

SANTOS, L. S. et al. Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas do capim-marandu e suas variações em função do pH. *Planta Daninha*, v. 26, n. 3, p.531-538, 2008.

SANTOS, K. C. dos. Análise Proteômica Comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo de diacilglicerol, Dissertação de mestrado, 2007.

SCHMITT, J. L.; WINDISCH, P. G. 2006a. Growth rates and age estimates of *Alsophila setosa* Kaulf. in southern Brazil. **American Fern Journal**, 96:103-111.

SCHMITT, J. L.; WINDISCH, P. G. 2006b. Phenological aspects of frond production in *Alsophila setosa* Kaulf. (Cyatheaceae: Pteridophyta) in southern Brazil. **Fern Gazette** 17: 263-270.

SEHNEM, A., Ciateáceas. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí. **Herbário Barbosa Rodrigues**. p.99-103.1978.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PALAZZO de MELLO, J. C., ROS PETROVICK. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999, 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J. C.; MENTZ, L. A. R. O. S.; PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007, p. 230, 237.

SOSSAE, F. C. Plantas Medicinais. Disponível em: <www.educar.sc.usp.br/biologia/prociencias/medicinais.html>. Acesso em: 20 nov. 2013.

SPORNE, K. R. 1970. The morphology of pteridophytes. The structure of ferns and allied plants. 3th ed. London. **Hutchinson University Library**.

SUN, J. *et al.* Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

TROPICOS. Taxonomia da espécie *Cyathea atrovirens*: <http://www.tropicos.org/Name> Acessado em 17 de janeiro de 2014.

TRYON, R. M.; TRYON, A.F. Ferns and Allied Plants, with **Special Reference to Tropical America**. New York: Springer- Verlag, 1982. 857 p.

WHO, Quality control methods for medicinal plant material. WHO Library Cataloguing in Publication Data, London, 1998, p. 41.

WINDISCH, P. G. 2002. Fern Conservation in Brazil. **Fern Gazette**, 16(6): 295-300.

WINDISCH, P. G. Pteridófitas da região norte-ocidental do Estado de São Paulo: guia para estudo e excursões. 2. ed. São José do Rio Preto: **UNESP**, 1992, 110p.

Woisk RG, Salatino A 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apicult Res 37: 99-105.

Lin SC, Chung TC, Lin CC, Ueng TH, Lin YH, Lin SY, Wang L 2000. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. Am J Chin Med 28: 163-173

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editoras da UFRGS e UFSC, 2001

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, 96: 67-202, 2002.

GOLA, G.; NEGRI, G.; CAPPELLETTI, C. Tratado de Botânica. 2 ed. Barcelona, Rio de Janeiro: Editora Labor, 1965.

SOSSAE, F. C. Plantas Medicinais. Disponível em: <www.educar.sc.usp.br/biologia/prociencias/medicinais.html>. Acesso em: 20 nov. 2013.

VICKERY, M. L. E.; VICKERY, B.; Secondary Plant Metabolism, The Macmillan Press LTD: London, 1981.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim. Nova, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

YAMAGUCHY,T; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 62, n. 6, 1998.

BRASIL.Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para a análise de sementes, Brasília: SNDA/DNDU/CLU, 1992.

FERREIRA,A.G., AQUILA, M. E. Alelopatia:uma área emergente da ecofisiologia.Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. v. 12,, 1997.

BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research, J. of Ethnopharmacol. v. 49, n. 2, 1993.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R.L. Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem.V.44, p.701 -705, 1998.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem.V.45, p.304 -309, 2000.

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G. E SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Mensagem doce, v. 46, p. 1998.

Lopes, R. M., Oliveira, T. T. de, Nagem, T. J. e Pinto, A. de S. Flavonóides. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 17, p. 18-22, 2000.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 7.ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1998.

WOISK RG, SALATINO A 1998. Analisis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apicult Res 37: 99-105.

WINDISCH, P. G. 2002. Fern Conservaton in Brazil. Fern Gazette16(6): 295-300.

LARGE, M. F.; BRAGGINS, J. E. Tree Ferns. Timber Press, 2004, 359 p.

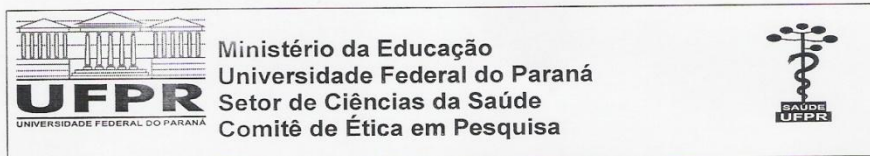
VELIOGLO, Y. S., (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural Food & Chemistry, 46, 4113–4117.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMES, P. The use of Artemia salina in toxicity testing. ATLA, v.20, p. 297-301, 1992.

SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D.; Phenolic antioxidants. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

ANEXO

Documento de Aprovação do Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, projeto de pesquisa CEP/SD 1033.158.10.11.



Curitiba, 01 de fevereiro de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)
Obdulio Gomes Miguel
Josiane de Fátima Gaspari Dias

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Estudo de produtos naturais sobre a função dos neutrófilos humanos”** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 01 de dezembro de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 01 de fevereiro de 2011.

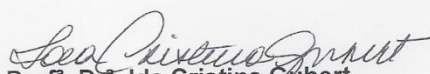
Registro CEP/SD: 1033.158.10.11

CAAE: 0090.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 01/08/2011.

Atenciosamente


Prof.ª Dr.ª Ida Cristina Gubert
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde